

Revers-genetische Charakterisierung des subgenomischen Promotors des Maus-Norovirus

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Eva Neugebauer

aus

Löbau

Bonn, September 2013

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

am

Institut für Virologie des Universitätsklinikums Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Drosten

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Misof

Tag der Promotion: 08.04.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Inhalt

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Norovirus	1
1.1.1	Historie	1
1.1.2	Taxonomie	1
1.1.3	Infektionsquellen und Übertragungswege	2
1.1.4	Immunität	3
1.1.5	Klinik	4
1.1.6	Therapie	4
1.1.7	Epidemiologie	5
1.2	Die Virusfamilie <i>Caliciviridae</i>	6
1.2.1	Klassifizierung	7
1.2.2	Virusmorphologie	7
1.2.3	Genomorganisation	9
1.2.4	Virusproteine	10
1.2.5	Replikation	12
1.3	Das murine Norovirus – ein Surrogatvirus für humane Noroviren	14
1.4	Reverse Genetik bei Caliciviren	16
1.5	Ziele der Arbeit	17
2.	MATERIAL	19
2.1	Bakterien	19
2.2	Plasmide	19
2.3	Synthetische Oligonukleotide	19
2.3.1	Amplifizierungsprimer der Genomanalyse	20
2.3.2	Amplifizierungsprimer des 5'-Terminus	20
2.3.3	Klonierungsprimer mit 5'-Phosphorylierung (PH)	21
2.3.4	Mutagenese-Primer	21

2.3.5	Vektorständige Primer	24
2.3.6	Sequenzierungsprimer.....	24
2.3.7	Quick Change Mutagenese-Primer.....	25
2.3.8	Real-Time RT-PCR Primer	25
2.4	Zellen und Virusstämme.....	25
2.4.1	Zellen	25
2.4.2	Virusstämme.....	26
2.5	Chemikalien	26
2.6	Kits und Enzyme	27
2.6.1	DNA-Techniken.....	27
2.6.2	RNA-Techniken	29
2.6.2.1	Reverse Transkription (RT) und RT-PCR.....	29
2.7	Lösungen, Puffer und Medien	30
2.7.1	PCR-Puffer	30
2.7.2	Nährmedien für <i>Escherichia coli</i> Stämme Stbl3, TOP10 und MC10-61.....	30
2.7.3	Medien und Zusätze für die Zellkultur	30
2.7.4	Agarose-Gelelektrophorese	30
2.7.5	Protein-biochemische Techniken	31
2.7.6	Northern Blotting	33
2.8	Verbrauchsmaterialien.....	34
2.9	Technische Geräte.....	35
2.10	Software	38
3.	METHODEN.....	39
3.1	Kultivierung von Zellen.....	39
3.1.1	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	39
3.1.2	Elektroporation eukaryotischer Zellen	40
3.1.5	Virus-Infektion eukaryotischer Zellen und Ernte von Viren	41
3.1.6	Virus-Titration und Plaque-Assay	41

3.1.7	Immortalisierung von MEFs.....	42
3.1.8	Subklonierung von MEFs	43
3.2	Mikrobiologische Methoden	43
3.2.1	Anzucht von Bakterien	43
3.2.2	Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	44
3.2.3	Transformation von Plasmid-DNA in CaCl ₂ -kompetente Bakterien	44
3.3	DNA-Techniken.....	44
3.3.1	Plasmid-Isolierung im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)	44
3.3.2	Plasmid-Isolierung im mittleren Maßstab (Midi-Präparation).....	45
3.3.3	Aufreinigen von DNA.....	45
3.3.4	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	47
3.3.5	Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Agarose.....	48
3.3.6	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen.....	48
3.3.7	Herstellung glatter Enden an DNA-Molekülen	48
3.3.8	Dephosphorylierung.....	49
3.3.9	Agarose-Gelelektrophorese	49
3.4	Klonierungsmethoden	50
3.4.1	Klonierung in den pCR®4-TOPO® Vektor.....	50
3.4.2	Klonierung in den pSMART® LCKan Vektor	50
3.4.4	Polymerase chain reaction (PCR).....	52
3.4.5	Gerichtete Mutagenese.....	52
3.4.6	Direkter PCR – basierter Nachweis von Plasmiden (Kolonie-PCR)	55
3.4.7	Sequenzierung	55
3.4.8	Amplifikation von cDNA	56
3.4.9	Amplifikation von dsDNA	57
3.4.10	Touch Down-PCR	58
3.4.11	Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	58
3.4.12	Real-Time PCR	60

3.5	RNA-Techniken	61
3.5.1	<i>In-vitro</i> Transkription.....	61
3.5.2	DNase-Verdau und Lithiumchlorid-Präzipitation	62
3.5.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäuren	62
3.5.4	Extraktion viraler RNA	62
3.5.5	Reverse Transkription (RT)	63
3.5.6	Reverse Transkription und PCR im Ein-Schritt-Verfahren (One-step RT-PCR)	64
3.5.7	Herstellung eines Standards zur Quantifizierung von viralen Genomkopien	65
3.5.8	RNA-Gelelektrophorese.....	65
3.5.9	Northern Blot.....	66
3.6.	Proteinanalyse.....	68
3.6.1	Gießen von Polyacrylamidgelen	68
3.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	68
3.6.3	Detektionsmethoden der Proteinanalyse	69
4.	ERGEBNISSE	70
4.1	Das zytopathogene murine Norovirus- (MNV) Isolat.....	70
4.1.1	Genomanalyse	70
4.1.2	Charakterisierung des 5'- Terminus	73
4.1.3	Quantifizierung des MNV: Etablierung einer spezifischen Real-Time RT-PCR	75
4.1.4	Darstellung des zytopathischen Effektes des MNV.....	77
4.2	Herstellung eines rekombinanten murinen Norovirus	78
4.2.1	Das reverse Genetiksystem des MNV	78
4.2.2	Klonierung von partiellen Fragmenten in das Vektorsystem pSMART LCKan.....	80
4.2.3	Zusammenbau des rekombinanten MNV cDNA-Klons.....	82
4.2.4	Insertion des 5'- Genomendes mit T7-Promotor	87
4.2.5	Insertion eines genetischen Markers	88
4.2.6	Produktion rekombinanter muriner Noroviren.....	89
4.3	Transfektion verschiedener Zelllinien mit rMNV	90

4.3.1	Immortalisierung und Subklonierung von MEFs	91
4.2.3	Transfektion der subklonierten MEFs	93
4.4	Mutagenese-Studie des subgenomischen Promotors	95
4.4.1	Optimierungsarbeiten am reversen Genetiksysteem	95
4.4.2	Die Entwicklung erster Promotormutanten	97
4.4.3	Mapping des subgenomischen Promotors.....	99
4.5	Das „auseinandergezogene“ Virus (stretched Virus)	103
4.6	Charakterisierung der subgenomischen Promotormutanten durch den Northern Blot	108
4.6.1	Etablierung der Northern Blot-Methodik.....	108
4.6.2	Analyse der subgenomischen Promotormutanten	111
4.7	Western Blot-Analyse der Promotormutanten.....	113
4.8	Ausgang der subgenomischen Promotorstudie	115
5.	DISKUSSION	119
5.1	Reverse Genetik.....	119
5.2	Optimierung des reversen Genetiksystems für MNV.....	121
5.3	Mapping des subgenomischen Promotors.....	123
5.4	Analyse der Auswirkungen des mutierten subgenomischen Promotors auf das virale Transkriptions- und Translationslevel	126
5.5	Das „auseinandergezogene“ Virus 8	127
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	129
7.	REFERENZEN	130
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	138
	Erklärung zur Dissertation	140
	Danksagung	141

1. EINLEITUNG

1.1 Das Norovirus

1.1.1 Historie

Der klassische Krankheitsverlauf der Norovirus-Gastroenteritis und ihre saisonale Ausprägung in den Herbst- und Wintermonaten wurden erstmals 1929 beschrieben, was dieser Krankheit den immer noch gebräuchlichen Namen „winter vomiting disease“ verlieh [1]. Ein bakterieller Erreger für diese neue Erkrankung konnte jedoch nicht isoliert werden. Deshalb wurde ab den 1960er Jahren vermutet, dass es sich bei der „winter vomiting disease“ um eine Erkrankung viralen Ursprungs handeln könnte [2]. 1972 gelang es einer Arbeitsgruppe erstmals in Stuhlfiltraten eines Gastroenteritisausbruchs ein Konglomerat aus 27 nm großen Viruspartikeln durch Immun-Elektronenmikroskopie (IEM) darzustellen. Dieser Ausbruch ereignete sich 1968 an einer Grundschule in Norwalk im US Bundesstaat Ohio. Dadurch wurde bewiesen, dass es sich hierbei um den Erreger der fortan als „Norwalk Gastroenteritis“ bekannten Erkrankung handelte [3]. Noroviren dieses 1968 in Norwalk dokumentierten Ausbruchs gelten auch heute noch als Referenzgenotyp für Noroviren der Genogruppe I [2, 4]. Durch die Entwicklung der Reversen Transkriptase - Polymerase - Kettenreaktion (RT-PCR) konnte ein Großteil des RNA-Virusgenoms in Form von cDNA-Konstrukten kloniert und charakterisiert werden. Demzufolge wurden 1990 die Norwalk-like-Viren der Familie *Caliciviridae* zugeordnet [5]. Gemäß einer Festsetzung des „International Committee on Taxonomy of Viruses“ erfolgte 2002 die Umbenennung der Norwalk-like-Viren in Noroviren (NV) [6].

1.1.2 Taxonomie

Die genetische Vielfalt der Noroviren wurde in der Literatur bereits vielfach beschrieben [7-11]. Der Genus *Norovirus* umfasst laut Zheng et al. fünf Genogruppen. In dieser Studie wurden 164 Virusstämme charakterisiert. Dadurch konnten 29 Viren in genetische Cluster eingeteilt werden, von denen acht in die Genogruppe I, 17 in die Genogruppe II, zwei in die Genogruppe III und jeweils einer in die Genogruppen IV und V gehörten [9]. Die Aminosäuresequenz des VP1 Kapsidproteins stimmte innerhalb eines genetischen Clusters zu mindestens 80 % überein. Arbeiten aus den Jahren 2007 und 2008 ordneten der Genogruppe IV ein weiteres genetisches Cluster, GIV.2, zu [12, 13].

Nur die Genogruppen I, II und IV enthalten nach aktuellem Wissensstand humanpathogene Viren [7, 9, 10, 14, 15]. Die Genogruppe III (GGIII) enthält bovine Virusstämme [16, 17] und die Genogruppe V (GGV) die murinen Noroviren. Letztere sind die einzigen Vertreter ihrer Spezies, für die ein effizientes Zellkultursystem und ein Kleintiermodell vorhanden ist [18, 19]. Die Genogruppe II (GGII) beinhaltet neben den humanpathogenen Genotypen auch einen porcinen Genotyp (GII.11) und ist weltweit am häufigsten vertreten [9, 20, 21]. 2007 und 2008 wurden GIV.2 Noroviren sogar in Löwen und Hunden identifiziert [12, 13].

Aufgrund der hohen Virulenz und hinsichtlich ihrer weltweiten Prävalenz haben rekombinante Noroviren in den letzten Jahren international viel Aufmerksamkeit erhalten [7, 14]. Wie alle RNA Viren positiver Polarität sind auch die Noroviren anfällig für einen „genetic-shift“ durch intra- und intertypische Rekombinationsvorgänge, sowie für einen „genetic-drift“ bedingt durch die fehlende Korrekturlese-Aktivität der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp). Viele Norovirusrekombinanten wurden bisher in den Genogruppen I bis III identifiziert [7, 22, 23], mit steigender Tendenz. Bei einer Vielzahl der rekombinanten Virusstämmen lag der so genannte „recombinant breakpoint“ im überlappenden Grenzbereich von ORF1/ORF2 [7].

1.1.3 Infektionsquellen und Übertragungswege

Noroviren sind hochinfektiöse, äußerst umweltstabile Erreger mit vielfältigen Infektionsquellen. Hauptsächlich findet eine Übertragung fäkal-oral durch eine Kontakt- oder Schmierinfektion statt [4, 24-26], weshalb Menschen als Erregerreservoir gelten. Das Virus kann auch durch Lebensmittel oder über den Luftweg mittels Aerosolen, die beim Erbrechen entstehen, übertragen werden [27-29]. Schwimmen in kontaminierten Gewässern kann ebenfalls zu einer Infektion führen [30, 31]. Durch seine sehr hohe Umweltresistenz ist das Norovirus auf kontaminierten Gegenständen und Lebensmitteln noch bis zu 30 Tagen nach der eigentlichen Kontamination nachweisbar [32-34].

Noroviren werden in hohen Konzentrationen durch Erbrochenes ausgeschieden. Im Stuhl wird die Viruslast jedoch auf lediglich $10^4 - 10^6$ Partikel pro Gramm geschätzt [8], was bis heute zu keiner Lebendvirus-Extraktion aus Stuhlproben aufgrund der zu niedrigen Konzentration führen konnte [35]. Mit einer minimalen Infektionsdosis von nur 10 bis 100 Viruspartikeln ist die Kontagiosität der Noroviren außerordentlich hoch [36]. Die Erregerausscheidung beginnt ca. 12 h vor Symptomeintritt und hält bis zu 14 Tage an. In manchen Fällen kann sie sogar wesentlich länger andauern [37].

In verschiedenen Säugetieren konnten Noroviren aller fünf Genogruppen identifiziert werden, z.B. in Mäusen, Kühen, Schweinen, Hunden, Löwen und Menschenaffen [12, 13, 38, 39]. Die Infektion einiger dieser Spezies mit bisher als ausschließlich humanpathogen geltenden Viren lässt die Frage nach einem tierischen Erregerreservoir aufkommen [7, 39]. Rekombinante Ereignisse zwischen menschlichen Noroviren und denen in Primaten vorkommenden Varianten wurden bereits beobachtet [39]. Außerdem gibt es deutliche Hinweise auf eine zoonotische Übertragung von bovinen Noroviren der Genogruppe III auf Menschen [40].

Eine zoonotische Übertragung von Noroviren findet nicht nur durch Kontakt mit infizierten Säugetieren, sondern auch durch das Verspeisen von rohen Austern und anderen Schalentieren statt. Dieser Infektionsweg ist ein Sonderfall, da die Austern nicht im Rahmen der Zubereitung kontaminiert werden. Stattdessen filtrieren Austern Meerwasser durch ihren Schlund und konzentrieren so Darmviren wie Polio-, Hepatitis A- und Noroviren in ihrem Verdauungstrakt [41]. Die Darmviren entstammen dabei zumeist Abwässern, die ungeklärt ins Meer geleitet wurden. Die Zellen der Darmschleimhaut der Austern sind mit Histo-Blutgruppen-Antigenen (HBGA) der Gruppe A ausgestattet, die auch im Menschen als Rezeptoren für Noroviren fungieren. Auf diese Weise bindet die Darmschleimhaut der Austern Noroviren der verschiedensten Genotypen kovalent [41]. Alle bisher untersuchten Austern wiesen mehr als nur einen Norovirusstamm auf, was schließlich zu Mehrfachinfektionen mit diversen Noroviren führte [42].

1.1.4 Immunität

In der Bevölkerung ist die Prävalenz von Antikörpern gegen Noroviren hoch. Studien zeigen, dass eine Einfachinfektion mit Noroviren eines spezifischen Typen zu einer ca. ein bis sechs monatigen Immunität führen [43-45]. Nach einer Mehrfachexposition dauert die Immunität dagegen länger an [45]. Eine Langzeitimmunität konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden [43-45]. Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine durch genetische Faktoren beeinflusste Suszeptibilität einzelner Personen [11, 42, 46]. Dabei wird der Schutz vor der Erkrankung mit dem Fehlen des Rezeptors für Noroviren assoziiert [35, 46, 47].

1.1.5 Klinik

Eine Infektion mit Noroviren zeichnet sich durch das Auftreten einer heftigen, durchschnittlich 12-60 Stunden andauernden Gastroenteritis aus. Plötzliches, explosionsartiges Erbrechen, gefolgt von einer wässrigen, unblutigen Diarrhö sind die Hauptmerkmale der Erkrankung [4, 48, 49]. Zusätzlich treten in der Regel Begleiterscheinungen wie Glieder- und Muskelschmerzen, abdominale Krämpfe und Fieber auf. Im Blutbild kommt es oft zu einem Leukozytenanstieg [4, 49]. Epidemiologische Studien zeigen, das Erbrechen vermehrt bei Kindern und Diarrhöe häufiger bei Erwachsenen auftreten [50].

Atypische Krankheitsverläufe werden speziell für Immungeschwächte und Menschen in besonderen Stresssituationen beschrieben. Eine immunsuppressive Therapie kann zu einer chronischen Diarrhö führen [51]. Soldaten im Kriegseinsatz zeigten ungewöhnliche Symptome wie Nackensteifheit, Verwirrtheit oder eine erhöhte Lichtempfindlichkeit [52].

Im Unterschied zu anderen Infektionen durch Caliciviren kann die Norovirusinfektion als eine lokale Infektion des Magen-Darm-Traktes angesehen werden [35, 53, 54]. Noroviren konnten bisher nicht im Serum infizierter Personen nachgewiesen werden [35].

1.1.6 Therapie

Die Therapie der Norovirus-Gastroenteritis erfolgt in erster Linie symptomatisch und konzentriert sich auf eine ausreichende Flüssigkeits- und Elektrolytenzufuhr. Eine spezifische virostatistische Therapie existiert bis zu diesem Zeitpunkt ebenso wenig wie ein ausreichend klinisch geprüfter Impfstoff. Zwar sind diesbezüglich Ansätze durch die Impfung mit rekombinanten Viruspartikeln (VLP) zu erkennen, doch kann durch orale oder intranasale Gabe dieser VLPs eine Infektion nicht verhindert, sondern nur der Krankheitsverlauf geschwächt werden. Es ist noch unklar, ob dieser Ansatz einen verlässlichen Schutz gegen neu auftretende Virusvarianten bilden kann [55, 56].

Deshalb ist die beste Therapie die Infektionsprävention, welche vor allem durch häufiges und gründliches Händewaschen sowie das Desinfizieren von Oberflächen mit einem umfassend viruziden Desinfektionsmittel (auf Aldehyd- oder Peressigsäurebasis) erreicht werden kann. Infizierte Personen sollten hinsichtlich der lang anhaltenden Erregerausscheidung bis zu drei Wochen nach Ausklingen der Symptome keine Speisen für Andere zubereiten [4, 35].

1.1.7 Epidemiologie

Aktuelle epidemiologische Studien belegen, dass das Norovirus der wichtigste Erreger akuter viraler Gastroenteritiden weltweit ist [20, 57-59]. Das Auftreten von Norovirusinfektionen ist in den letzten Jahren stark angestiegen [60-63]. Gründe dafür sind in einer erhöhten globalen Prävalenz von Noroviren der Genogruppe II und in der Verbesserung der diagnostischen Methoden zu finden [61, 64]. Ein weiterer Anstieg der Erkrankungsfälle wird vorausgesagt [63, 65].

Detektionsmethoden für Noroviren variieren zwischen einzelnen Laboratorien stark. Oft sind neue Methoden nur in staatlichen Referenzlaboren vorhanden und diese sind aufgrund der genetischen Vielfalt der Noroviren nicht in der Lage alle vorhandenen Stämme zu detektieren. Außerdem beruhen viele Daten auf Schätzungen und Hochrechnungen kleiner Studien. Deshalb ist die Auswertung epidemiologischer Daten zur Prävalenz von Noroviren schwierig.

Durchfallerkrankungen führen Schätzungen zufolge bei Kindern weltweit zu etwa 1,8 Millionen Todesfällen jährlich [66]. In dieser Altersgruppe sind etwa 12 % der Gastroenteritiden mit schwerem Verlauf von Noroviren verursacht, wobei der Anteil in Entwicklungs- und Industrieländern gleich bleibt. Noroviren verursachen in Entwicklungsländern jährlich etwa 1,1 Millionen Krankenhausaufenthalte und 218.000 Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren. In Industrieländern sind dagegen ca. 64.000 Krankenhausaufenthalte und 900.000 Arztbesuche pro Jahr auf Noroviren zurückzuführen [67-69]. Für erwachsene Personen wurde bereits im Jahr 1999 vom CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) geschätzt, dass jährlich 23 Millionen Menschen allein in den USA an Noroviren erkranken und 7 % aller durch Diarrhö verursachten Todesfälle auf eine Infektion mit Noroviren zurückzuführen sind.

Auch die Frage nach dem Anteil von Koinfektionen mit bakteriellen als auch viralen Erregern und Noroviren verschiedener Typen spielt dabei eine grundlegende Rolle. Laut einer koreanischen Studie litten 35 % der Norovirus-erkrankten gleichzeitig an einer Rotavirusinfektion, 7 % an einer Koinfektion mit Adenoviren und 2 % litten zusätzlich an Salmonellen. Insgesamt waren 41 % aller Norovirus-infizierten Träger eines zweiten oder dritten enteropathogenen Keimes [70]. Auch über Koinfektionen von Noroviren und humanen Bocaviren wurde 2007/2008 berichtet [71, 72]. In Europa liegt jedoch die Rate der Koinfektionen laut einer Analyse der Jahre 2001-2006 aus 13 europäischen Ländern mit nur 2 % deutlich niedriger [62]. Eine Koinfektion mit verschiedenen Genotypen der Noroviren tritt dagegen häufiger auf und wird mit dem Konsum von Austern oder anderen Schalentieren assoziiert [48]. Der Verzehr von Meerestieren ist unter Umständen bedenklich, was erst kürzlich eine Studie über eine Koinfektion von Noroviren und Hepatitis A-Viren in spanischen Muscheln zeigte [73].

Außerdem kommt es zu einer jahreszeitlichen Schwankung der Norovirusinfektionen, denn ein vermehrtes Auftreten findet in den Wintermonaten statt [4, 28]. Verschiedene Ausbrüche haben jedoch gezeigt, dass dieser „Wintergipfel“ fast ausschließlich durch eine Zunahme der Ausbrüche durch Viren des Stammes GII.4 hervorgerufen wird. Andere Stämme der Genogruppe II zeigen diese jahreszeitliche Häufung weniger [62, 74].

In Deutschland wie auch in den anderen europäischen Ländern dominierte in den letzten Jahren die Norovirus Untergruppe GII.4. Seit Einführung der Meldepflicht nach §7 Abs. 1 Nr. 34 Infektionsschutzgesetz (IfSG) im Jahr 2001 ist eine steigende Tendenz zu beobachten. 2004 war die Norovirusgastroenteritis erstmals mit knapp 65.000 Erkrankungen die häufigste übermittelte Erkrankung. Jungen im Kindesalter scheinen dabei öfter von einer Erkrankung betroffen zu sein, wogegen eine Infektion von Frauen bei erwachsenen Personen überwiegt [4]. Die in Deutschland ermittelten Infektionszahlen und zirkulierenden Stämme stimmen mit den Beobachtungen anderer europäischer Staaten sowie Nordamerika und Australien überein [4, 63, 75].

1.2 Die Virusfamilie *Caliciviridae*

Noroviren gehören zur Familie der *Caliciviridae*. Der Name ist von dem griechischen Wort *kalyx* für „Kelch“ abgeleitet und gibt einen Hinweis auf die kelchartig vertieften Strukturen der Ikosaeder-Seitenflächen, welche in elektronenmikroskopischen Aufnahmen sichtbar werden [76, 77].

Caliciviren besitzen ein nichtumhülltes Kapsid und ein Plusstrang-RNA-Genom. Während des Replikationszyklus wird eine subgenomische RNA synthetisiert. Humanpathogene Vertreter findet man in den Gattungen Noro- und Sapovirus. Auch das Hepatitis E Virus war früher in dieser Familie integriert, ist jedoch seit 2009 ein offizielles Mitglied der Familie *Hepeviridae*.

Die Anzucht in Zellkultur ist bisher nur bei einigen wenigen Vertretern der Familie möglich. Das Vesivirus FCV (felines Calicivirus) wächst effizient in Zellkultur und bildet Plaques in Nieren-Fibroblasten [78]. Das Lagovirus RHDV (Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche) infiziert primäre Hepatozyten [79], das Recovirus TV (Tulane Virus) wird in Affennierenzellen kultiviert und das murine Norovirus repliziert effizient in dendritischen Zellen und in einer Makrophagenzelllinie [80]. Für die humanpathogenen Caliciviren ist bisher kein Zellkultursystem bekannt.

1.2.1 Klassifizierung

Die Familie *Caliciviridae* wird in fünf akzeptierte und vier vorläufige Genera unterteilt: Die akzeptierten Genera *Vesivirus*, *Lagovirus* und *Nebovirus* sowie die unklassifizierten Genera *Recovirus*, *Bavovirus*, *Nacovirus* und *Valovirus* [6, 77, 81, 82] umfassen ausschließlich tierpathogene Erreger. Humanpathogene Viren, die beim Menschen Durchfallerkrankungen verursachen, sind den Gattungen *Norovirus* und *Sapovirus* zugeordnet [81]. Eine Übersicht der klassifizierten Genera ist in Tabelle 1.1 dargestellt.

Die zuletzt entdeckte Gattung *Nebovirus* beinhaltet nur eine Spezies, die Rinder infiziert [83-85]. Die unklassifizierten Genera *Bavovirus* und *Nacovirus* wurden in Hühnern gefunden [86, 87], wogegen Recoviren und Valoviren aus dem Kot von Primaten [88] und Schweinen [89] extrahiert wurden.

Tab. 1. 1: Klassifizierung der Familie *Caliciviridae*. Übersicht der Genera mit den verschiedenen Spezies.

Genus	Reservoir: Mensch	Reservoir: Tier
<i>Norovirus</i> (NoV)	Norwalkvirus	Murines Norovirus
	Humanes Norovirus Alpatron	Bovines Norovirus
	Humanes Norovirus Saitama	Porcines Norovirus
		Norovirus der Auster
<i>Sapovirus</i> (SaV)	Sapporovirus (SV)	Porcines Entero-Sapovirus
	Manchester-Human-Calicivirus	Nertz-Entero-Sapovirus
<i>Vesivirus</i> (VeV)	-	Felines Calicivirus
		Vesikulärexanthemvirus
<i>Lagovirus</i> (LaV)	-	Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche
		European-Brown-Hare-Syndrom-Virus
<i>Nebovirus</i> (NV)	-	Newbury-1 Virus

1.2.2 Virusmorphologie

Caliciviren besitzen ein membranloses, sphärisch-ikosaedrisches Kapsid, was einen Durchmesser von 27 bis 34 nm aufweist. Das Kapsid besteht aus 180 Einheiten des Virion-Proteins VP1 („major capsid protein“), welches bei Noroviren ein Molekulargewicht von 59 kDa besitzt. Es besteht aus zwei Domänen, der sog. „Shell“ (S) und „Protruding“ (P) Domäne [90]. Bei Noroviren modellieren 225 N-terminal lokalisierte, hochkonservierte Aminosäurereste die S-Domäne, welche die zusammen-

hängende Virushülle formt. Die P-Domäne bildet Vorsprünge aus, die von der Virushülle absteigen und im Elektronenmikroskop sehr gut sichtbar sind (Abbildung 1.1 A). Sie besteht ihrerseits aus zwei voneinander abzugrenzenden Subdomänen, P1 und P2 (Abbildung 1.1 B/C). Die P2-Region befindet sich innerhalb der P1-Region und teilt diese in P1-1 und P1-2 [8, 91-93]. P2 weist dabei die variabelste Aminosäuresequenz des Kapsids auf und wird für die Virus-Zell-Bindung und somit für antigenetische Eigenschaften verantwortlich gemacht [8, 91, 93, 94]. Mutationen in der S- und in der P2-Domäne des Kapsidproteins VP1 führen zum Auftreten neuer Virusstämme. Finden Mutationen in der P2-Domäne statt, können daraus oftmals epidemiologisch bedeutsame Virusstämme resultieren [93]. Des Weiteren ist die P2-Subdomäne für die Anheftung der Virionen an den zellulären Rezeptor verantwortlich.

Das virale Kapsid spielt eine wichtige Rolle in der Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen. Caliciviren besitzen gegenüber Chlor, hohen Temperaturen und sauren pH-Werten eine beachtliche Stabilität [95], woraus unter anderem neben der geringen Infektionsdosis das hochansteckende Verhalten der Viren resultiert.

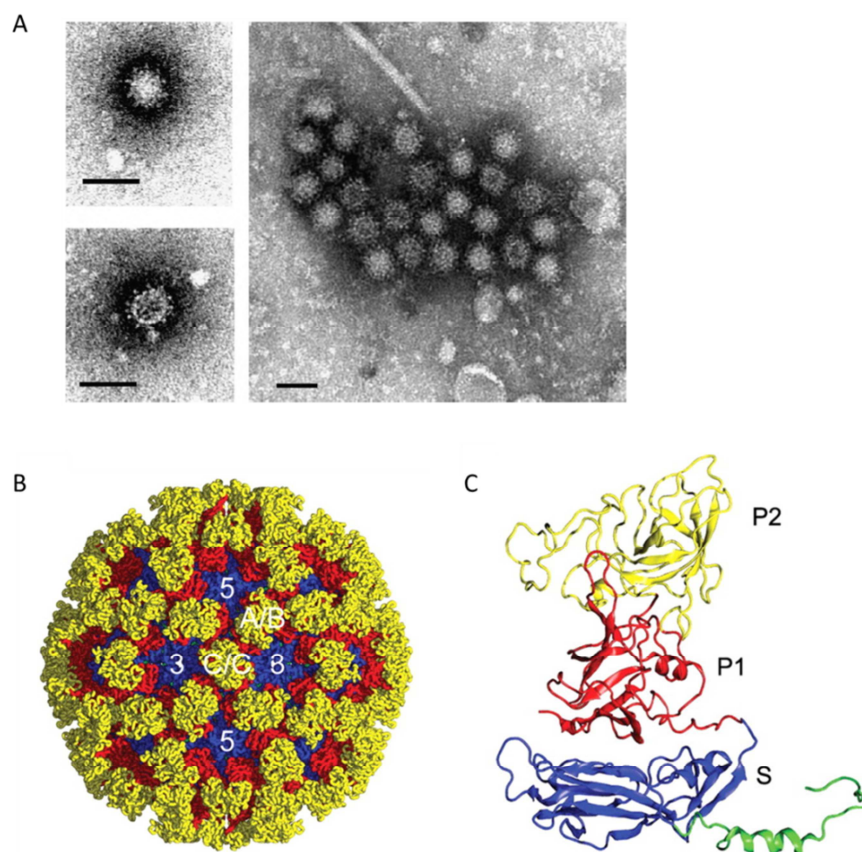


Abb. 1. 1: Morphologie der Caliciviren.

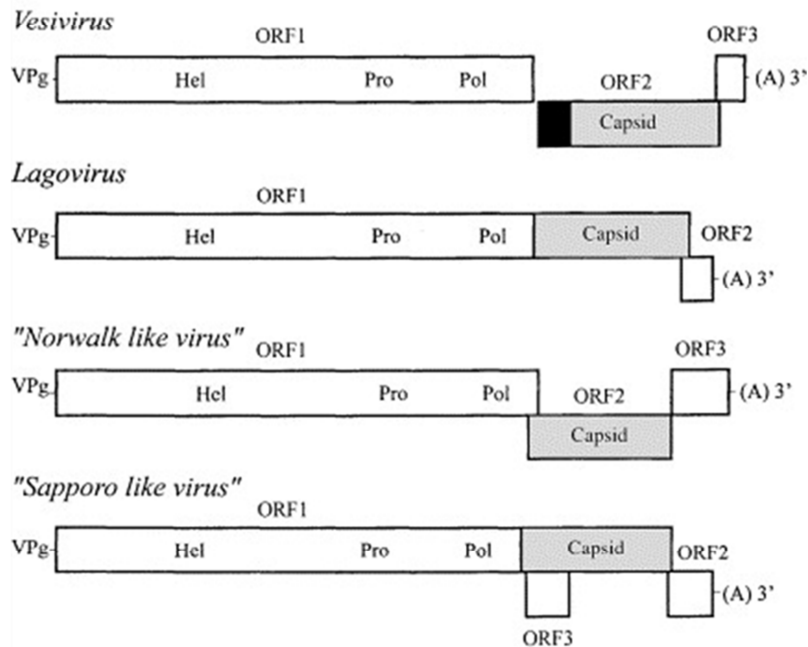
(A) Humanes Norovirus durch Transmissions-Elektronenmikroskopie dargestellt [96]. (B) X-Ray Struktur von FCV entlang der ikosahedrischen 2-fach Achse. Die Lage von A/B und C/C Dimeren sowie die ikosahedrische 3-fach und 5-fach Achse wird angezeigt [97]. (C) Anordnung der VP1-Domänen. Abgebildet sind: S-Domäne (blau), P1 (rot) und P2 (gelb) [97].

1.2.3 Genomorganisation

Das Genom der Caliciviren besteht aus einzelsträngiger RNA, die in Plusstrangorientierung vorliegt und an den 3'-Enden polyadenyliert ist. Das Norwalkvirus weist eine Länge von 7654 Basen auf, das feline Calicivirus (Genus Vesivirus) 7690 und das Virus der hämorrhagischen Kaninchenseuche (Genus Lagovirus) 7437 Basen. An die 5'-Enden des RNA-Genoms ist bei den tierischen Caliciviren und bei humanen Noroviren ein virales Protein, das VPg, kovalent gebunden. In den 5'- und 3'-Bereichen der genomischen RNA befinden sich kurze, nichttranslatierbare Sequenzfolgen. Sequenzanalysen ergaben drei offene Leserahmen, die an den Enden teilweise überlappen. In der 5'-orientierten Hälfte wird grundsätzlich ein Vorläuferprodukt für die Nichtstrukturproteine codiert. Der Leserahmen der 3'-orientierten RNA-Hälfte dient der Synthese des Kapsidproteins. Ein weiterer Leserahmen bildet ein kleines basisches Protein aus, das zweite Strukturprotein (VP2) der Caliciviren. Die Vertreter der verschiedenen Genera unterscheiden sich in der Genomorganisation. Vesi- und Noroviren besitzen drei getrennte Leserahmen für die Nichtstrukturproteine (ORF1), das Kapsidprotein (ORF2) sowie das kleine Strukturprotein (ORF3). Bei Lago- und Sapoviren sind die Leserahmen ORF1 und ORF2 miteinander verbunden. Das VP2 ist innerhalb der Familie *Caliciviridae* variabel in der Größe (12 bis 29 kDa) und divergent in der Sequenz bestimmter Gruppen [98].

Alle 5'-Genomenden beginnen mit einem terminalen pGpU. Diese Sequenz wiederholt sich innerhalb des Genoms und gehört zum Anfang eines subgenomischen RNA-Transkripts, welches mit dem viralen 3'-Genomende abschließt [99-101]. Zusätzlich ist diese subgenomische RNA am 5'-Ende kovalent mit einem VPg verbunden (Abbildung 1.2).

Genomic RNA (7.4-7.7 kb)



Subgenomic RNA (2.2-2.4 kb)

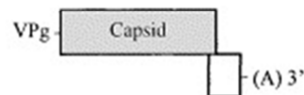


Abb. 1. 2: Genomorganisation der Caliciviren.

Die Anordnung der Leserahmen unterscheidet sich bei den Vertretern der unterschiedlichen Gattungen. Der weiße Kasten zeigt die bisher charakterisierten Nichtstrukturproteine. Die subgenomische RNA ist wie auch die genomische RNA am 5'-Ende kovalent mit dem VPg verbunden und am 3'-Ende polyadenyliert. Für die Gattung der Vesiviren zeigt die schwarze Box den Teil der Kapsidprotein-Vorstufe, welcher posttranslational abgespalten wird, das sog. „Leader Protein“ [102].

1.2.4 Virusproteine

Die absolute Anzahl der durch ORF1 codierten Nichtstrukturproteine (NS) und ihrer Vorläufer ist für Caliciviren bisher nicht bekannt [91]. In Analogie zu den Virusproteinen anderer RNA-Viren wie den Picornaviren, wurde in den bisherigen Studien von sechs Nichtstrukturproteinen ausgegangen [91, 103]. Bisher konnten erst vier dieser sechs Proteine charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um die Proteine NTPase, Protease, RNA-abhängige-RNA-Polymerase (RdRp) und das VPg [104-108]. Folgende Reihenfolge der Nichtstrukturproteine gilt für Caliciviren: N-terminales Protein (NS1-2),

NTPase (NS3), kleines Protein 20-30 kDa groß (NS4), VPg (NS5), virale Protease (NS6) und RNA-abhängige RNA-Polymerase [91, 103]. Die Synthese der Nichtstrukturproteine erfolgt über ein großes Vorläuferprotein (ca. 200 kDa), welches posttranslational durch die virale Protease zu den einzelnen Proteinen prozessiert wird [107, 109]. Die virale Protease ist eine Serin-Protease, welche typisch für die trypsinähnlichen Proteasen der Positivstrang-RNA-Viren ist [104].

Bei den Genera Lago- und Sapovirus sind die Leserahmen ORF1 und ORF2 miteinander verbunden. Deshalb wird ein großes Vorläuferprotein der Struktur- und Nichtstrukturproteine gebildet und von der viralen Protease gespalten.

Bei den Genera Vesi- und Norovirus wird das Kapsidprotein durch den Leserahmen ORF2 codiert, dabei weisen Vesiviren eine Besonderheit auf. Das Kapsidprotein (VP1) wird zunächst als Vorläuferprotein synthetisiert. Erst durch eine proteolytische Abspaltung von 128 Aminosäuren am aminoterminalen Ende, der sogenannten (sog.) Leader-Sequenz, entsteht durch die virale Protease das reife Kapsidprotein. Die Funktion dieser Leader-Sequenz war lange Zeit unbekannt und wird heute mit dem zytopathischen Effekt assoziiert [110]. Wird die subgenomische RNA in eukaryotischen Expressionssystemen *in-vitro* exprimiert, kann die Bildung zu virusähnlichen, RNA-losen Partikeln (VLPs) in einem Self-Assembly-Prozess erfolgen. Dies ist ein äußerst effizienter Vorgang [111, 112]. Auch die *in-vitro* Expression von ORF2 führt zur Bildung von VLPs, jedoch in bis zu zwölfmal geringeren Konzentrationen als dies durch eine Expression der gesamten subgenomischen RNA, inkl. ORF3 (VP2), zu beobachten ist [112, 113]. Studien zeigen die Präsenz von VP2, dem sog. „minor capsid protein“, in zwei unterschiedlichen Formen: eine dephosphorylierte Form in VLPs und eine phosphorylierte Form in RNA-haltigen Viruspartikeln [114, 115]. Da das VP2 ein stark basisches Protein ist, bindet es vermutlich in seiner phosphorylierten Form die virale RNA und verpackt sie in das Kapsid [113].

In reifen Calicivirus Virionen werden drei Proteine gefunden: VP1, VP2 und VPg [105]. Das VP1 (ca. 60 kDa) liegt in 180 Kopien (90 Dimere) pro Virion vor [116]. Das VP2 (12 – 29 kDa) kommt in nur einer von zwei Kopien pro Virion vor. Ein Hinweis auf die direkte Interaktion zwischen den Kapsidproteinen VP1 und VP2 wurde bisher für Noroviren [115] und das feline Calicivirus [117] berichtet. Das VPg kommt in Virionen mit bis zu 2 Kopien pro Partikel vor [118] und ist in infizierten Zellen kovalent an subgenomische und genomische RNA gebunden [108, 119]. Obwohl es in Virionen vorkommt, fungiert es hauptsächlich als Nichtstrukturprotein während der Replikation. Dabei verbindet es sich mit dem Genom und interagiert mit dem zellulären Translationskomplex und der ribosomalen 40S Untereinheit [120, 121].

1.2.5 Replikation

Bei der Replikationsstrategie teilen die Caliciviren viele Eigenschaften mit denen anderer Plusstrang-RNA-Viren. Zuerst muss das Virion jedoch mit der Wirtszelle interagieren, bevor der Eintritt der Partikel in die Zelle über Endozytose-Vesikel erfolgen kann und das RNA-Genom in das Zytoplasma freigelassen wird. Diese ersten Interaktionen mit der Zelle sind für Caliciviren noch nicht weitgehend verstanden, doch spielt dabei die Rezeptor-Erkennung eine essentielle Rolle. Mit Hilfe von virusähnlichen Partikeln konnte demonstriert werden, dass z.B. Noroviren bestimmte Kohlenhydrate die in ABH- und Lewis-Blutgruppenantigenen vorkommen, als Rezeptoren für den Eintritt in die Zelle nutzen [35, 122].

Der initiale Schritt im Vermehrungszyklus ist die Translation der Nichtstrukturproteine bei den Vesi- und Noroviren beziehungsweise das Fusionsprodukt der Nichtstruktur- und Kapsidproteine bei den Lago- und Sapoviren unter Verwendung des Plusstrang-RNA-Genoms als mRNA. Dieses wird durch die Protease autokatalytisch gespalten, wodurch die Funktion der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp) in der Zelle vorliegt [123]. Durch sie werden in der Zelle zwei verschiedene Negativstrangkopien gebildet: der Gegenstrang zur genomischen RNA, der dann als Matrize für die Synthese neuer Virusgenome dient sowie eine subgenomische RNA, welche die Bereiche der zum 3'-Ende des Genoms gelegenen Leserahmen umfasst (ca. 2500 Basen) [124]. Von diesen subgenomischen RNA-Negativsträngen werden die subgenomischen mRNAs gebildet (Abbildung 1.3). An ihren 5'-Enden sind sie kovalent mit dem VPg verbunden, die 3'-Enden sind polyadenyliert. Von dieser mRNA werden die Kapsidproteine bei den Vesi- und Noroviren sowie das kleine Strukturprotein auf ORF3 translatiert. Die Kapsidproteine interagieren zu Vorstrukturen der Viruspartikel, in welche die Virus-RNA eingelagert wird.

Experimentelle Daten des feline Calicivirus beschreiben einen Terminations/Reinitiations-Mechanismus für die VP2 Translation [125]. Dieser Mechanismus involviert eine sog. „Termination upstream ribosomal binding site“ (TURBS), wodurch das Verhältnis zwischen VP1/VP2 während der Replikation reguliert wird [126]. Die Sequenz für das Signal der VP2 Translation ist am Ende von ORF2 lokalisiert. Ein ähnlicher Mechanismus der Termination/Reinitiation wurde auch für das murine Norovirus beschrieben [127].

Die Vorgänge bei der Verpackung der viralen RNA sowie bei der Reifung und Freilassung viraler Partikel aus der Wirtszelle sind bisher nur wenig verstanden. Die VPg-gebundene genomische und subgenomische RNA wurde in Partikeln verschiedener Dichte gefunden, was darauf hinweist, dass keine Verpackung in dasselbe Virion stattfindet [99, 101]. Ein möglicher Vorgang zur Freilassung viraler Partikel könnte die Veränderung der zellulären Membran auf Grund von Apoptose sein [128].

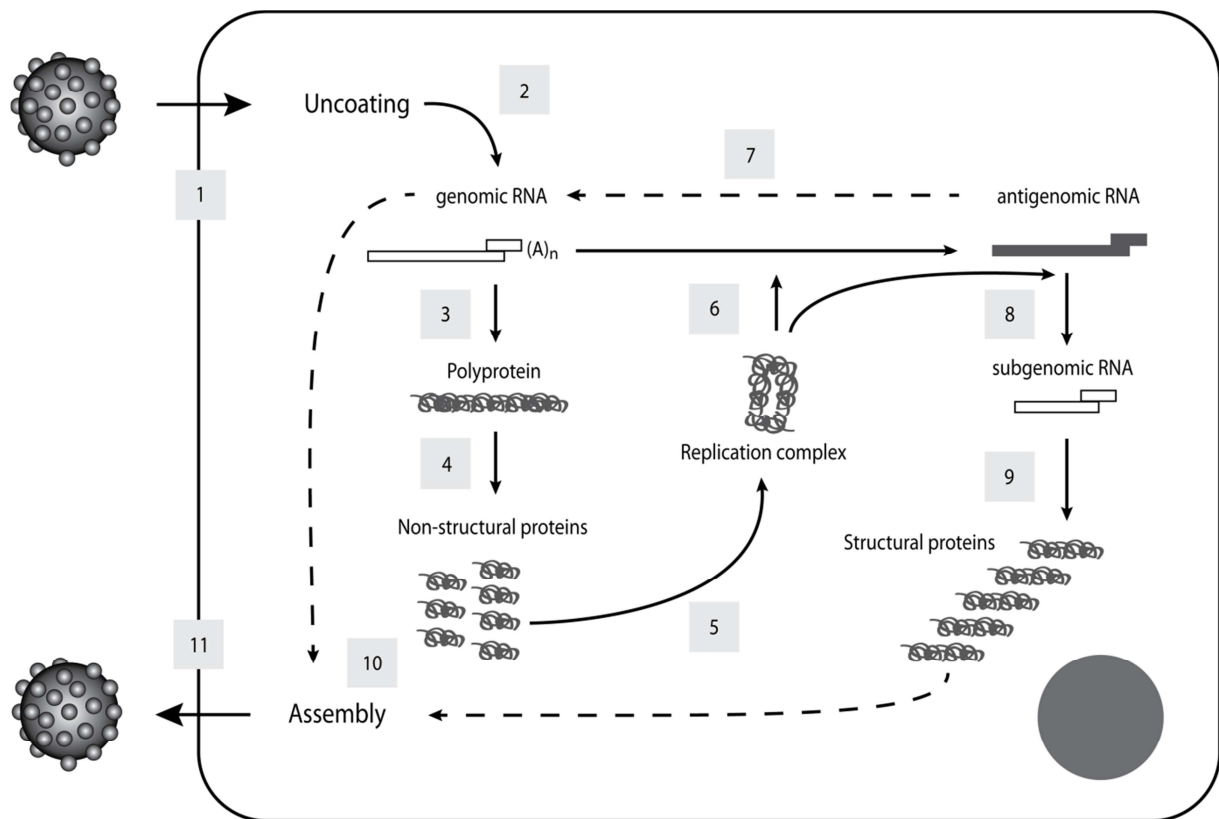


Abb. 1. 3: Der Replikationszyklus von Caliciviren.

Nach der Anheftung an den zellulären Rezeptor internalisiert das Virion in die Zelle (Schritt 1). Es folgt die Freisetzung des viralen Genoms (Schritt 2) und die Translation des Vorläuferproteins (Polypolypeptid des ORF1) im Zytoplasma (Schritt 3). Die autokatalytische Spaltung des Polypeptids erfolgt durch die Protease (Schritt 4), wodurch der Replikationskomplex freigesetzt wird (Schritt 5). Die Replikation des Norovirus-Genoms sowie die Transkription der antigenomischen (Schritt 7) und der subgenomischen RNA (Schritt 8) findet statt. Die Strukturproteine VP1 und VP2 werden durch die subgenomische RNA translatiert (Schritt 9). Virale RNA wird schließlich verpackt (Schritt 10) und das Virion aus der Zelle freigesetzt (Schritt 11) [129].

1.3 Das murine Norovirus – ein Surrogatvirus für humane Noroviren

Aufgrund des nicht vorhandenen Zellkultursystems für humane Noroviren fehlen noch viele Informationen über die Biologie des Virus. Das murine Norovirus (MNV) wurde erstmals 2003 von der Arbeitsgruppe H.W. Virgin beschrieben [18] und ist aus biologischer Sicht den humanen Noroviren ähnlich. Daher bietet sich die Möglichkeit, Grundmechanismen der Replikation und Pathogenität im natürlichen Wirt (der Maus) zu erforschen. Die Autoren zeigten, dass bei immunkompetenten Mäusen eine Infektion mit MNV asymptomatisch verläuft. Im Gegensatz dazu führte eine Infektion mit fäkal-oral übertragenem MNV bei immundefizienten Mäusestämmen zu einer letalen Erkrankung mit Enzephalitis, Meningitis, Vaskulitis, Hepatitis und anderen Organmanifestationen. 2004 wurde schließlich die erfolgreiche Anzucht des MNV in Makrophagen und dendritischen Zellen beschrieben [19]. Murine Noroviren sind in der Lage problemlos in RAW264.7 Zellen (murine Makrophagenzelllinie, ATCC TIB-71) zu replizieren, wobei ein CPE (zytopathischer Effekt) dieser Zellen durch eine deutliche Deformation und eine schnelle Zerstörung der Makrophagen nach etwa zwei bis vier Tagen charakterisiert ist. Damit ist das MNV bislang der einzige Vertreter der Gattung *Norovirus*, für den ein effizientes Zellkultursystem vorhanden ist. Aufgrund der engen phylogenetischen Verwandtschaft des MNV mit humanen Noroviren besitzt es die gleichen genetischen Eigenschaften, wodurch nun die Replikation und Immunologie von Noroviren auch *in-vitro* untersucht werden können.

Die Prävalenz von MNV in Versuchstierhaltungen unterscheidet sich in verschiedenen Regionen und Tierhaltungen weltweit. Bisherige Publikationen ergaben eine Prävalenz von 22,1% [130] bzw. 32,4% [131] in Nordamerika, von 23% [132] bzw. 15% [133] in Südkorea und in Deutschland von 20,3% [134], 31,8% [134], bzw. 64,3% [135]. Damit ist MNV das am höchsten prävalente Virus bei Versuchsmäusen und liegt damit etwa 10fach höher als das am nächsten prävalente Virus, das Maus Hepatitis Virus, mit 5,5% [134].

Das Genom des murinen Norovirus ist etwa 7,4 Kilobasen lang und besteht aus vier Open Reading Frames (ORF1, ORF2, ORF3 und ORF4), die sich an den Enden teilweise überlappen (Abbildung 1.4A). Am 3'-Ende ist die Virus-RNA polyadenyliert. ORF1 codiert für ein Polyprotein, das aus sechs Nichtstrukturproteinen besteht (siehe Kapitel 1.1.5). ORF2 codiert für das Kapsidprotein VP1 und ORF3 für das kleine Basisprotein VP2. Über ORF4 ist bisher nur wenig bekannt. Er ist innerhalb von ORF2 lokalisiert [136] und vermutlich für die Regulierung der angeborenen Immunantwort verantwortlich [137]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass Apoptose durch das Produkt von ORF4 eingeleitet wird [137].

Murine Noroviren reagieren äußerst sensitiv auf Interferon [18, 138, 139]. Eine Induktion der Interferon-Antwort resultiert sofort in einer signifikanten Reduktion der Virusausbeute. Studien zeigen, dass das MNV-Genom basengepaarte RNA-Strukturen am 5'-Ende der genomischen RNA aufweist [83]. Die Transfektion von 5'-triphosphorylierten MNV würde deshalb eine Interferon-Induktion hervorrufen. Eine weitere Studie verdeutlicht zudem, welche drastischen Auswirkungen Typ I und Typ II Interferone auf die MNV Protein-Synthese ausüben [138].

Neben der genomischen RNA wird eine subgenomische RNA-Spezies, die den Bereich von ORF2 und ORF3 umfasst und ebenfalls kovalent mit einem VPg verbunden ist, in infizierten Zellen gefunden (siehe Kapitel 1.2.5). Eine Co-Transfektion der genomischen RNA mit unterschiedlichen Mengen subgenomischer RNA führte jedoch zu keinem Anstieg im Viruswachstum [140]. Die Initiierung der RNA-Synthese tritt dabei an bestimmten Standorten, den sog. Promotoren auf. Besonders viel Aufmerksamkeit wurde bisher den subgenomischen Promotoren beigemessen. Sie wurden speziell für Pflanzen- und Alphaviren charakterisiert [141-143] und sind überwiegend am 3'-Ende des RNA-Minusstrangs lokalisiert. Subgenomische Promotoren weisen oftmals eine oder mehrere Stem-Loop Strukturen auf. Derartige Sekundärstrukturen wurden im Jahr 2008 auch für das MNV beschrieben (Abbildung 1.4B) [83, 144]. Doch ist der genaue Mechanismus der Initiierung der Transkription für Caliciviren noch weitgehend unbekannt.

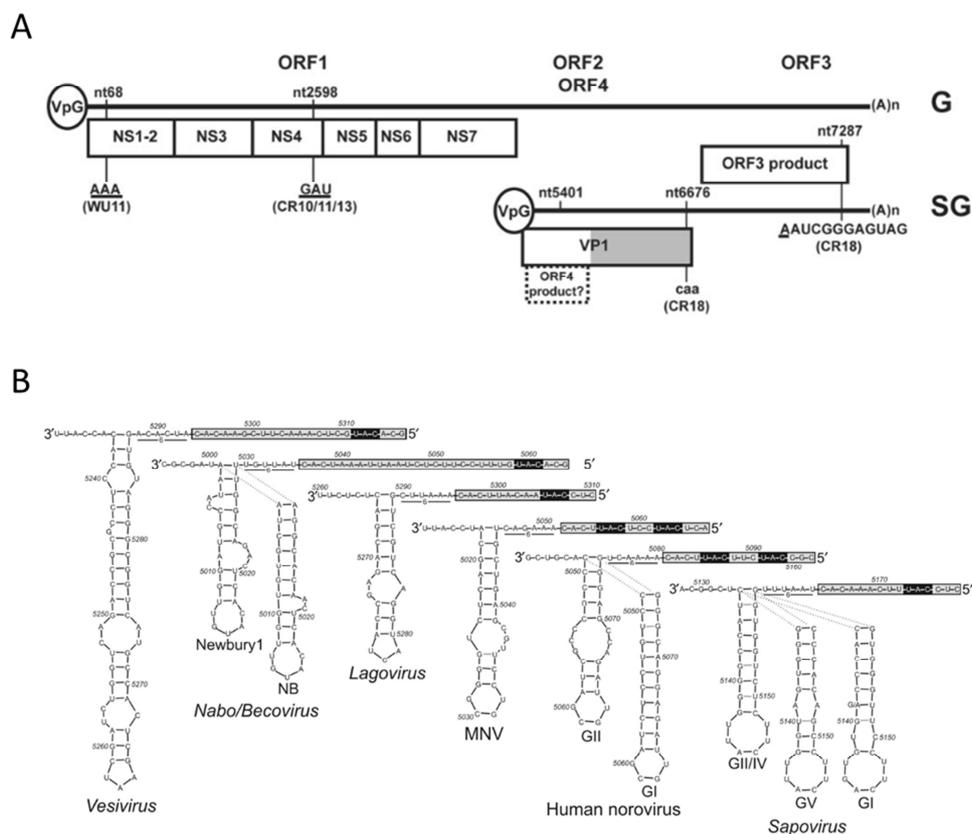


Abb. 1. 4: Genomische Organisation des MNV.

(A) Das VPg ist kovalent an die genomische (G) und subgenomische (SG) RNA gebunden. Die Nukleotid (nt) - Nummerierung basiert auf der Sequenz von MNV-1 (Genbank-Nr.: AY228235). Die P-Domäne von VP1 ist grau unterlegt [136]. (B) Darstellung der Konsensus-RNA Sekundärstrukturen bei Caliciviren, die dem subgenomischen Transkript vorgelagert sind. Die Strukturvorhersage wurde mittels Alifold durchgeführt und ist in antisense-Orientierung (3' nach 5') abgebildet. Ein hochkonserviertes 6-Basen Element direkt nach dem Stem-Loop ist bei allen Calicivirus-Gattungen unterstrichen dargestellt [83].

1.4 Reverse Genetik bei Caliciviren

Als ein essentielles Hilfsmittel bei der Untersuchung biologischer Eigenschaften von Viren ermöglicht reverse Genetik eine gezielte Veränderung in einem viralen Genom. In der Familie der Caliciviren wurde es bereits mehrfach angewendet [123, 145-148]. Das erste reverse Genetiksystem wurde für das feline Calicivirus (FCV) im Jahr 1995 entwickelt [147]. Ein full-length cDNA-Klon wurde dafür mit einem vorgeschalteten T7 DNA-abhängigen RNA-Polymerase Promotor produziert. In Gegenwart der T7-Polymerase erfolgte anschließend die Synthese der RNA vom cDNA-Klon, wodurch virale RNA-Transkripte hergestellt wurden, die dem viralen full-length-Genom entsprachen. Die Infektiosität dieser RNA-Transkripte war dabei abhängig von der Präsenz eines 5'-Cap Analogons [145, 147]. In einer weiteren Studie wurden rekombinante Viren durch die Transfektion von FCV cDNA-Klonen in Zellen hergestellt, die zuvor mit einem modifizierten Vakzinia Virus Ankara Stamm (MVA) infiziert wurden, um so die T7-Polymerase für die FCV RNA-Synthese in den Zellen zu exprimieren [149]. Durch die Anwendung des reversen Genetiksystems und einer damit verbundenen Transposon-Mutagenese konnten kürzlich sogar rekombinante Reporterviren mit einem Green Fluorescent Protein (GFP) und einem rot fluoreszierenden Protein DsRed für FCV charakterisiert werden [150].

Für das murine Norovirus wurden bislang drei verschiedene reverse Genetiksysteme vorgestellt. Das erste System wurde 2007 beschrieben und basiert auf einer Pockenvirus-Infektion, um so die T7-Polymerase im Zytoplasma für die MNV-Replikation bereitzustellen (FPV-T7) [151]. Durch diese Arbeit wurden erstmalig in der Norovirus-Forschung Aspekte des Lebenszyklus bekannt. Die Identifizierung von RNA-Strukturen [83], Virulenz-Faktoren des Kapsidproteins [152] sowie der 3'-untranslatierte Bereich (UTR) [144] konnten bestimmt werden. Noch im gleichen Jahr wurde ein RNA-Polymerasel-Promotor basiertes System publiziert, doch führte dieses zu deutlich niedrigeren Virus-Ausbeuten als das FPV-T7 System [153]. Eine dritte Methode wurde 2010 veröffentlicht und beruht auf einem „ScriptCap post-transcriptional enzymatic Capping“-System. Die Transfektion der viralen RNA erfolgte dabei direkt in susceptible RAW264.7 Zellen mittels Neon®, einem neuartigen Elektroporator der Fa. Invitrogen [154]. Diese Anwendung erhöhte die Ausbeute an infektiösen Viren erneut und brachte durch eine Transposon-Mutagenese rekombinante Viren mit einem FLAG Tag (Oktapeptid) im Bereich von NS4 und VP2 hervor [140].

Für humane Noroviren existiert bisher kein reverses Genetiksystem. Es gibt jedoch Studien, in denen funktionale Nichtstrukturproteine als cDNA-Klone synthetisiert wurden. Die Transfektion von full-length cDNA-Klonen der Noroviren (GI und GII) in Zellen, die zuvor mit MVA infiziert wurden, führte zu einer Synthese der Nichtstrukturproteine und zur Replikation viraler RNA [155]. Ein Helfervirus-freies, zellbasiertes RNA-Replikonsystem wurde für Noroviren ebenso beschrieben [156]. Doch fehlt es diesen Systemen an ausreichend Stabilität und Effizienz.

1.5 Ziele der Arbeit

Das 2003 identifizierte murine Norovirus (MNV) ist leicht kultivierbar und aus molekularbiologischer Sicht den humanen Noroviren ähnlich. Daher können die Grundmechanismen der Replikation und Pathogenität des MNV *in-vitro* analysiert werden. In dieser Arbeit sollte das MNV als Surrogatvirus für humane Noroviren unter Zuhilfenahme reverser Genetik näher charakterisiert werden, um einen tieferen Einblick in die Biologie der Noroviren zu erhalten. Das Ziel reverser Genetik an MNV ist die Untersuchung der Auswirkungen von Mutationen im Virusgenom auf die Replikation. Alle beschriebenen Genetiksysteme besitzen jedoch einen grundlegenden Nachteil. Sie sind zeit- und arbeitsintensive Methoden, so dass es äußerst schwierig erscheint, eine größere Anzahl von Mutanten zur gezielten Analyse verschiedener Genomabschnitte zu produzieren. Bisher wurde keine detaillierte Mutationsstudie des MNV veröffentlicht, obwohl die beschriebenen Systeme zur Verfügung stehen (1.4). In dieser Arbeit wurde deshalb versucht, ein möglichst schnelles, robustes und effizientes reverses Genetiksystem für eine erste gerichtete Mutagenese zu entwickeln.

Als zu charakterisierenden Bereich dieser Mutagenese-Studie wurde der subgenomische Promotor von MNV ausgewählt. Caliciviren exprimieren ein subgenomisches Transkript, welches die Strukturgene codiert. Diese biochemische Eigenschaft teilen sie unter anderem mit den Mitgliedern der Virusfamilie *Togaviridae* und Hepatitis E. Innerhalb der Caliciviren ist dieser Bereich hochkonserviert. Bioinformatische Analysen zeigten zudem eine kurz davor liegende Stem-Loop Struktur [83]. Der Stem-Loop könnte mit dem RNA-abhängigen RNA-Polymerase-Komplex interagieren, um so die Transkription zu initiieren. Durch einen Wechsel von Genomreplikation zu Virus-Assembly und Abgabe könnte diese Struktur auch die Transkription, durch die Synthese der Strukturproteine, regulieren. Bisher gibt es jedoch noch nicht viele Informationen zu dieser Thematik bei Noroviren. Nur für das Calicivirus RHDV wurde bereits im Jahr 2004 ein Mapping des subgenomischen Promotors vorgenommen [157].

Die Ziele dieser Arbeit waren deshalb zum einen die Entwicklung eines reversen Genetiksystems für MNV, vor allem jedoch dessen Anwendung, um eine Vielzahl von Mutanten im Bereich des subgenomischen Promotors zu produzieren. Ein umfangreiches Promotor-Scanning sollte durchgeführt werden, um detaillierte Informationen über die Lage und Aktivität des subgenomischen Promotors sowie den Einfluss auf das Viruswachstum *in-vitro* zu erhalten. Zudem sollten Auswirkungen eines mutierten Promotors auf das Transkriptions- und Translationsniveau analysiert werden.

Damit leistet diese Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung weiterer biochemischer Eigenschaften von Noroviren. Die Charakterisierung des Promotors könnte unter Umständen in Zukunft als molekularbiologisches Hilfsmittel für die Insertion exogener Sequenzen in das MNV-Genom und der damit verbundenen Integration in den Virus-Replikationszyklus dienen, z.B. Herstellung rekombinanter Reporterviren.

2. MATERIAL

2.1 Bakterien

Zur Vermehrung von Plasmiden dienten die *Escherichia coli*-Stämme One Shot® Stbl3™ und One Shot® Top10 (Invitrogen, Karlsruhe) sowie MC10-61 als Wirtsbakterien. Letzterer Bakterienstamm wurde von Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, USA) zur Verfügung gestellt.

2.2 Plasmide

Jegliche murine Norovirus (MNV) cDNA-Klone wurden mit Hilfe des Clone SMART Blunt Cloning Kits (Lucigen, Middleton, USA) generiert und enthalten als Vektorrückgrat das Plasmid pSMART-LCKan. Die cDNA-Klone des murinen Norovirus stehen im Vektor unter der Kontrolle eines T7-Promotors. Das low-copy Plasmid enthält als Selektionsmarker ein Kanamycin-Resistenzgen. Zur Klonierung von partiellen Genomabschnitten wurde das TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing mit dem Vektor pCR® 4-TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Bei diesem Vektor handelt es sich um ein high-copy Plasmid, das sowohl ein Ampicillin- als auch ein Kanamycin-Resistenzgen besitzt. Zusätzlich trägt dieser Vektor eine T7-Promotorsequenz abwärts der Klonierungsstelle. Der Vektor diente parallel zur Generierung von *in-vitro* RNA-Transkripten zur Erstellung eines Standards für die MNV Real-Time RT-PCR sowie für die Klonierung von Subfragmenten des MNV-Genoms.

2.3 Synthetische Oligonukleotide

Die folgenden tabellarisch aufgeführten Primer wurden bei der Fa. Tib-Molbiol (Berlin, Deutschland) bzw. Fa. Biomers (Ulm, Deutschland) synthetisiert. Die Oligonukleotide mit einer *sense*-Orientierung enthalten ein F (forward; fwd), Primer mit einer *antisense*-Orientierung ein R (reverse; rev) im Namen und beziehen sich, wenn nicht anders vermerkt, auf das murine Norovirus-Genom des Stammes Berlin 06/06/DE (Gen-Bank: EF531291).

2.3.1 Amplifizierungsprimer der Genomanalyse

Tab. 2. 1: Oligonukleotide zur Amplifizierung des MNV-Genoms in sense-Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
5'Berlin	5'-GTGAAATGAGGATG-3'
5'sgPromo	5'-GTAAATGAGGATG-3'
T7_kurz	5'-TCTAGAGAATTCGTCATCACCTGCTTACTA-3'
F37	5'-GTGCGCAACACAGAGAAACGCAA-3'
F70	5'-AGACTTCATCTAAGGCTAGTGTCT-3'
F740	5'-CCTGTGCAAGACTGGAATGTTGA-3'
F1066	5'-CTCCTCGGTGGCATTGGTATGGCT-3'
F2302	5'-CAACGGGGCCACCTACAATGTCA-3'
F3264	5'-GTGAGATGCTTGCCCTGGCGGTCA-3'
F3820	5'-GAGAACCGCCTTGAGAACAC-3'
F4780	5'-TGACCGCCAGCTCCTCTGGACTA-3'
F5599	5'-TGGTCTGCATGTTGTACACGCCACT-3'
F6789	5'-CAAGCACGACCTTGAGATGCT-3'

Tab. 2. 2: Oligonukleotide zur Amplifizierung des MNV-Genoms in antisense-Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
PolyA_NotI	5'-GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
R515	5'-CATCAATCACGGCCTGACACA-3'
R661	5'-ATCCCAACGATCCAGCAGCAGAC-3'
R1446	5'-TGCCATGCTAATCCTAGCTAGCAG-3'
R2552	5'-AGGTGTAACCGTGATCCAGT-3'
R3473	5'-TGGTGGCTGCCACATGCACTCCA-3'
R3991	5'-TTGCCATCTCATACATGTTGTT-3'
R5117	5'-ATCCTGGCCGCTGGCTTCAGAG-3'
R6278	5'-TTCTGGGAGCTCATCTTGGAAGGA-3'

2.3.2 Amplifizierungsprimer des 5'- Terminus

Tab. 2. 3: Oligonukleotide zur Amplifizierung des 5'- Genomendes in sense und antisense Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
F84	5'-GCTAGTGTCTCCTTGGAGCACCTAGCTTACTCTCTTCGGAGAGTGAAGA-3'
F204	5'-GGGCCGCACGCCGGGCTCCCGTGACGCGGAGTGATGCACGCGTGCTGAT-3'
F144	5'-TACATGACCCCTCTGAGCAGGAAGCTCAGCCCGGTACCCCTGCGGCCCT-3'
R103	5'-GCTCCAAAGGAGACACTAGCCTTAGATGAAGTCTTTTTGTTTTGCGTTTCTCTGTGTTGC-GCACAGAGGACGCAGA-3'
R163	5'-TGCTCAGGAGGGGTCATGTAGTTAACTTCATCTTCACTCTCCGAAGAGAG-3'
R223	5'-GGGAGCCCGCGTGCGGCCCGTGGCGTGAAGGGCCGCAAGGGTACCGGG-3'
R283	5'-GACTTCTCTCTCCTCCCACTCATTGAAGATCAGCACGCGTGCATCACT-3'

2.3.3 Klonierungsprimer mit 5'-Phosphorylierung (PH)

Die folgenden Primer wurden für die Klonierung von Genom-Subfragmenten in den pSMART LCKan Vektor (Lucigen, Middleton) verwendet.

Tab. 2. 4: Oligonukleotide für die Klonierung in pSMART LCKan.

Name	Nukleotidsequenz
F4780-PH	5'-TGACCGCCAGCTCCTCTGGACTA-3'
RNotI-PH	5'-GCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
R3473-PH	5'-TGGTGGCTGCCACATGCACTCCA-3'
F2302-PH	5'-CAACGGGGCCACCTACAATGTCA-3'
F70-PH	5'-AGACTTCATCTAAGGCTAGTGTCT-3'
FAarI_T7-PH	5'-ATCAGCTGTTACTAATACGACTCACTATAGTAAATGAGGATGGCAACGCCATCTTCTGCGTCTCTGTGCG-3'
R283-PH	5'-GACTTCTTCTCTCTCCCACTCATTGAAGATCAGCACGCGTGCATCACT-3'
FAgeI-PH	5'-CGCCCATAGTGGGATAGA-3'
RVirus8-PH	5'-CACTCATCTCATATTATCACTCATCTCATTTACAAAGACTGCTGAGCGTTCCTGC-3'
FVirus8-PH	5'-GCAGGAACGCTCAGCAGTCTTTGTAAATGAGGATGAGTGATAATATGAGGATGAGTG-3'

2.3.4 Mutagenese-Primer

Die folgenden Primer wurden für die Generierung der Mutanten über Extensions-PCR verwendet. Die von der Wildtypsequenz abweichenden Nukleotide sind als Kleinbuchstabe gekennzeichnet.

Tab. 2. 5: Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese des subgenomischen Promotors in sense-Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
MNV2_fwd	5'-CAGCAGTCTTTGTtAATGAGGATGAG-3'
MNV3_fwd	5'-CAGCAGTCTTTGTcAATGAGGATGAG-3'
MNV4_fwd	5'-CAGCAGTCTTcGTAAATGAGGATGAG-3'
MNV5_fwd	5'-CAGCAGTCTTcGTgAATGAGGATGAG-3'
MNV6_fwd	5'-TCAGCAGTCTTcGTcAATGAGGATGAGTGA-3'
MNV7_fwd	5'-CAGCAGTtTTcGTcAATGAGGATGAG-3'
MNV8_fwd	5'-GCAGGAACGCTCAGCAGTCTTTGTAAATGAGGATGAGTGATAATATGAGGATGAGTG-3'
MNV8.1_fwd	5'-GCAGGAACGCTCAGCAGTCTTTGTAAAcGAGGATGAGTGATAATATGAGGATGAGTG-3'
MNV8.2_fwd	5'-GCAGGAACGCTCAGCAGTCTTTGTAAATGAaGATGAGTGATAATATGAGGATGAGTG-3'
MNV8.3_fwd	5'-GCAGGAACGCTCAGCAGTCTTTGTAAATGAGGAcGAGTGATAATATGAGGATGAGTG-3'
MNV8.4_fwd	5'-GCAGGAACGCTCAGCAGTCTTTGTAAATGAGGATGAaTGATAATATGAGGATGAGTG-3'
MNV.V8Ala_fwd	5'-CTTTGTAAATGAGGATGAGTGATAATGCGAGGATGAGTGATG-3'
MNV.V8Ins_fwd	5'-TCTTTGTAAATGAGGATGAGTGATAATtATGAGGATGAGTG-3'
MNV.V8Del_fwd	5'-TCTTTGTAAATGAGGATGAGTGATAAAATGAGGATGAGTG-3'
MNV9_fwd	5'-ACGCTCAGCAGTgTTTGTAAATGAG-3'
MNV10_fwd	5'-GAACGCTCAGcTCTTTGTAAATG-3'
MNV11_fwd	5'-CGCAGGAACGCTCtGCAGTCTTTGT-3'
MNV12_fwd	5'-GACCCCGCAGGAACGgTCAGCAGTC-3'
MNV13_fwd	5'-GACCCCGCAGGAAGCGCTCAGCAGTC-3'
MNV14_fwd	5'-TGAGACCCCGCAaGAACGCTCAGCA-3'
MNV15_fwd	5'-TGCTGAGACCCcCAGGAACGCTCAG-3'
MNV15_fwd-T	5'-TGCTGAGACCCCTCAGGAACGCTCAG-3'
MNV15_fwd-A	5'-TGCTGAGACCCcCAGGAACGCTCAG-3'
MNV16_fwd	5'-GATGGATGCTGAGACgCCGCAGGAAC-3'
MNV16_fwd-T	5'-GATGGATGCTGAGACTCCGCAGGAAC-3'
MNV17_fwd	5'-GACGATGGATGCTGAaACCCCGCAG-3'
MNV18_fwd	5'-TGGGACGATGGATGCaGAGACCCCGCAG-3'
MNV19_fwd	5'-TGGGACGATGGAcGCTGAGACCCCGCAG-3'
MNV20_fwd	5'-GTGCGCTTTGGGACcATGGATGCTGAG-3'
MNV21_fwd	5'-GTGCGCTTTGGcACGATGGATGCTGAG-3'
MNV22_fwd	5'-ACGCTCAGcTgTTTGTAAATGAG-3'
MNV23_fwd	5'-GAACGCTCtGcTGTCTTTGTAAATG-3'

MNV24_fwd	5'-CGCAGGAACGgTctGCAGTCTTTGT-3'
MNV25_fwd	5'-GACCCCGCAGGAgCGgTCAGCAGTC-3'
MNV26_fwd	5'-GACCCCGCAaGAgCGCTCAGCAGTC-3'
MNV27_fwd	5'-TGAGACCCcCAaGAACGCTCAGCA-3'
MNV28_fwd	5'-TGCTGAGACgCCcCAGGAACGCTCAG-3'
MNV29_fwd	5'-GATGGATGCTGAaACgCCGCAGGAAC-3'
MNV30_fwd	5'-GACGATGGATGCaGAaACCCCGCAG-3'
MNV31_fwd	5'-TGGGACGATGGAcGCaGAGACCCCGCA-3'G
MNV32_fwd	5'-TGGGACGcTGGAcGCTGAGACCCCGCAG-3'
MNV33_fwd	5'-GTGCGCTTTGGcAcATGGATGCTGAG-3'
MNV34_fwd	5'-TGCTGAGACCCCGCAGCAGGAACGCTCAG-3'
MNV35_fwd	5'-TGGATGCTGAGACCCCGGAACGCTCAGCAG-3'

Tab. 2. 6: Oligonukleotide für die ortsgerichtete Mutagenese des subgenomischen Promotors in antisense-Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
MNV2_rev	5'-CTCATCCTCATTaACAAAGACTGCTG-3'
MNV3_rev	5'-CTCATCCTCATTgACAAAGACTGCTG-3'
MNV4_rev	5'-CTCATCCTCATTtACgAAGACTGCTG-3'
MNV5_rev	5'-CTCATCCTCATTcACgAAGACTGCTG-3'
MNV6_rev	5'-TCACTCATCCTCATTgACgAAGACTGCTGA-3'
MNV7_rev	5'-CTCATCCTCATTgACgAAaACTGCTG-3'
MNV8_rev	5'-CACTCATCCTCATATTATCACTCATCCTCATTTACAAAGACTGCTGAGCGTTCCTGC-3'
MNV8.1_rev	5'-CACTCATCCTCATATTATCACTCATCCTCgTTTACAAAGACTGCTGAGCGTTCCTGC-3'
MNV8.2_rev	5'-CACTCATCCTCATATTATCACTCATctTCATTACAAAGACTGCTGAGCGTTCCTGC-3'
MNV8.3_rev	5'-CACTCATCCTCATATTATCACTCgTCCTCATTTACAAAGACTGCTGAGCGTTCCTGC-3'
MNV8.4_rev	5'-CACTCATCCTCATATTATCaTCATCCTCATTTACAAAGACTGCTGAGCGTTCCTGC-3'
MNV.V8Ala_rev	5'-CATCACTCATCCTCGCATTATCACTCATCCTCATTTACAAAG-3'
MNV.V8Ins_rev	5'-CACTCATCCTCATaATTATCACTCATCCTCATTTACAAAGA-3'
MNV.V8Del_rev	5'-CACTCATCCTCATTTATCACTCATCCTCATTTACAAAGA-3'
MNV9_rev	5'-CTCATTTACAAAcACTGCTGAGCGT-3'
MNV10_rev	5'-CATTTACAAAGACaGCTGAGCGTTC-3'
MNV11_rev	5'-ACAAAGACTGCaGAGCGTTCCTGCG-3'
MNV12_rev	5'-GACTGCTGAcCGTTCCTGCGGGGTC-3'
MNV13_rev	5'-GACTGCTGAGCGcTCCTGCGGGGTC-3'
MNV14_rev	5'-TGCTGAGCGTTctTGCGGGGTCTCA-3'
MNV15_rev	5'-CTGAGCGTTCCTGgGGGGTCTCAGCA-3'
MNV15_rev-T	5'-CTGAGCGTTCCTGAGGGGTCTCAGCA-3'
MNV15_rev-A	5'-CTGAGCGTTCCTGTGGGGTCTCAGCA-3'
MNV16_rev	5'-GTTCTGCGGcGTCTCAGCATCCATC-3'
MNV16_rev-T	5'-GTTCTGCGGAGTCTCAGCATCCATC-3'
MNV17_rev	5'-CTGCGGGGTtTCAGCATCCATCGTC-3'
MNV18_rev	5'-CTGCGGGGTCTctGCATCCATCGTCCCA-3'
MNV19_rev	5'-CTGCGGGGTCTCAGCgTCCATCGTCCCA-3'
MNV20_rev	5'-CTCAGCATCCATgGTCCCAAGCGCAC-3'
MNV21_rev	5'-CTCAGCATCCATCGTgCCAAAGCGCAC-3'
MNV22_rev	5'-CTCATTTACAAAcACaGCTGAGCGT-3'
MNV23_rev	5'-CATTTACAAAGACaGCaGAGCGTTC-3'
MNV24_rev	5'-ACAAAGACTGCaGAcCGTTCCTGCG-3'
MNV25_rev	5'-GACTGCTGAcCGcTCCTGCGGGGTC-3'
MNV26_rev	5'-GACTGCTGAGCGcTctTGCGGGGTC-3'
MNV27_rev	5'-TGCTGAGCGTTctTGgGGGGTCTCA-3'
MNV28_rev	5'-CTGAGCGTTCCTGgGgcGTCTCAGCA-3'
MNV29_rev	5'-GTTCTGCGGcGTtTCAGCATCCATC-3'
MNV30_rev	5'-CTGCGGGGTtTctGCATCCATCGTC-3'
MNV31_rev	5'-CTGCGGGGTCTctGCgTCCATCGTCCCA-3'G
MNV32_rev	5'-CTGCGGGGTCTCAGCgTCCAgCGTCCCA-3'
MNV33_rev	5'-CTCAGCATCCATgGTgCCAAAGCGCAC-3'
MNV34_rev	5'-CTGAGCGTTCCTGCTGCGGGGTCTCAGCA-3'
MNV35_rev	5'-CTGCTGAGCGTTCGCGGGGTCTCAGCATCCA-3'

Tab. 2. 7: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese des subgenomischen Promotors in 5'- Richtung, sense-Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
Mut-1fwd	5'-TGCCTGGGTGCGCTTcGGGACGATGGATG-3'
Mut-2fwd	5'-TGCCTGGGTGCGaTTTGGGACGATGGATG-3'
Mut-3fwd	5'-TGCCTGGGTaCGCTTTGGGACGATGGATG-3'
Mut-4fwd	5'-ACCGGTCTG TCCTGCGaTGGGTGCGCTTTGGGACG-3'
Mut-5fwd	5'-ACCGGTCTGTCTaCGCTGGGTGCGCTTTGGGACG-3'
Mut-6fwd	5'-TCCCACGCCACCGGTCaGTCCTGCGCTGG-3'
Mut-7fwd	5'-TCCCACGCCACCGaTCTGTCCTGCGCTG-3'
Mut-8fwd	5'-AGTGGGATAGaAaTGGTGGTC-3'
Mut-9fwd	5'-AGTGGGATAGaAaTGGTGGTCCCACG-3'
Mut-10fwd	5'-CCCATAGTGGGATAGaAaTGGTGGTCCCACGCC-3'
Mut-11fwd	5'-GGTCTCCAAGGAGGcTCCCATAGTGGGATAG-3'
Mut-12fwd	5'-TATAGGACTGTGGCTTcTcGGGTCTCCAAGGAGGC-3'
Mut-13fwd	5'-TGCATGGTGAAAAGTAtTATAGGACTGTGGCTTCCCG-3'
Mut-14fwd	5'-TCCCAATTGATGGCaCTGCTCGGTGAGGCTGC-3'
Mut-15fwd	5'-CTGGACATGCTCAGAGgCCCTCCCAATTGATGGC-3'
Mut-16fwd	5'-TCGAGACCCTaCCTGGACATG-3'
Mut-17fwd	5'-ACCACCAaAATCCCTTCGAG-3'
Mut-18fwd	5'-AGTCCTCTGGACcAAAGGAC-3'
Mut-19fwd	5'-TGCCAGCATTGAtCGCCAGCTCCTC-3'
Mut-20fwd	5'-TTCGCCGCGCgATAGTCGGTGACCAG-3'
Mut-21fwd	5'-TGGCTTTGAGGCGaTATGGTCTTCTCC-3'
Mut-22fwd	5'-TGAAGTGACCCGaATTGACCTGAC-3'
Mut-23fwd	5'-AGAGGGACTCCCaTCTGGCTGCCCTGCAC-3'
Mut-24fwd	5'-TGACATTATGGTaCGCCTTTCCCCGAAC-3'

Tab. 2. 8: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese des subgenomischen Promotors in 5'- Richtung, antisense-Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
Mut-1rev	5'-CATCCATCGTCCCgAAGCGCACCCAGCGCA-3'
Mut-2rev	5'-CATCCATCGTCCCAaTcGCACCCAGCGCA-3'
Mut-3rev	5'-CATCCATCGTCCCAAGCGtACCCAGCGCA-3'
Mut-4rev	5'-CGTCCCAAGCGCACCCATcGCAGGACAGACCGGT-3'
Mut-5rev	5'-CGTCCCAAGCGCACCCAGCGtAGGACAGACCGGT-3'
Mut-6rev	5'-CCAGCGCAGGACTgACCGGTGGCGTGGGA-3'
Mut-7rev	5'-CAGCGCAGGACAGAtCGGTGGCGTGGGA-3'
Mut-8rev	5'-GACCACCAttTCTATCCCACT-3'
Mut-9rev	5'-CGTGGGACCACCAttTCTATCCCACT-3'
Mut-10rev	5'-CACTATGGGCaGCCTCCTTGGGA-3'
Mut-11rev	5'-CTATCCCACTATGGGCaGCCTCCTTGGAGACC-3'
Mut-12rev	5'-GCCTCCTTGGAGACCCGaGAAGCCACAGTCCTATA-3'
Mut-13rev	5'-CGGGAAGCCACAGTCCTATAaTACTTTTACCATGCA-3'
Mut-14rev	5'-GCAGCCTCACCGAGCAGtGCCATCAATTGGGA-3'
Mut-15rev	5'-GCCATCAATTGGGAGGGcCTCTGAGCATGTCCAG-3'
Mut-16rev	5'-CATGTCCAGGtAGGGTCTCGA-3'
Mut-17rev	5'-CTCGAAGGGATTtTGGTGGT-3'
Mut-18rev	5'-GTCCTTTgTCCAGAGGAGCT-3'
Mut-19rev	5'-GAGGAGCTGGCGaTCAATGCTGGCA-3'
Mut-20rev	5'-CTGGTCACCGACTATcGCGCGGCGAA-3'
Mut-21rev	5'-GGAGAAGACCATAcGCCTCAAAGCCA-3'
Mut-22rev	5'-GTCAGGGTCAATtCGGGTCACTTCA-3'
Mut-23rev	5'-GTGCAGGGGcAGCCAGAtGGGAGTCCCTCT-3'
Mut-24rev	5'-GTTGCGGGGAAAGGCGtACCATAATGTCA-3'

2.3.5 Vektorständige Primer

Tab. 2. 9: Oligonukleotide von pSMART-LCKan (Lucigen, Middleton).

Name	Nukleotidsequenz
SL1	5'-CAGTCCAGTTACGCTGGAGTC-3'
SR2	5'-GGTCAGGTATGATTTAAATGGTCAGT-3'
pSR-16	5'-TAAATGGTCAGTATTGAGCG-3'
pSF+4	5'-CAGTTACGCTGGAGTCTGAG-3'

Tab. 2. 10: Oligonukleotide von pCR®4-TOPO®(Invitrogen, Karlsruhe).

Name	Nukleotidsequenz
M13_fwd	5'-TGA GTT TCG TCA CCA GTA-3'
M13_rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'

2.3.6 Sequenzierungsprimer

Tab. 2. 11: Oligonukleotide zur Sequenzierung des MNV in sense-Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
F70	5'-AGACTTCATCTAAGGCTAGTGTCT-3'
F740	5'-CCTGTGCAAGACTGGAATGTTGA-3'
F1066	5'-CTCCTCGGTGGCATTGGTATGGCT-3'
F2302	5'-CAACGGGGCCACCTACAATGTCA-3'
F3264	5'-GTGAGATGCTTGCCCTGGCGGTCA-3'
F4780	5'-TGACCGCCAGCTCCTCTGGACTA-3'
F5599	5'-TGGTCTGCATGTTGTACACGCCACT-3'
F5972	5'-GACCTTCACCATGATTGAGCAGGA-3'
F6910	5'-TCTCACACTGATGGGGCA-3'
F6097	5'-CTCGCTCGACCTGGTGGATG-3'
F6789	5'-CAAGCACGACCTTGAGATGCT-3'

Tab. 2. 12: Oligonukleotide zur Sequenzierung des MNV in antisense-Orientierung.

Name	Nukleotidsequenz
R474	5'-GACACCCATCACCATACCGTTG-3'
R515	5'-CATCAATCACGGCCTGACACA-3'
R1446	5'-TGCCATGCTAATCCTAGCTAGCAG-3'
R2552	5'-AGGTGTAACCGTGATCCCACT-3'
R3473	5'-TGGTGGCTGCCACATGCACTCCA-3'
R5117	5'-ATCCTGGCCGCTGGCTTCAGAG-3'
R6278	5'-TTCTGGGAGCTCATCTTGAAGGA-3'
R1250	5'-GCTTGAAGACCTCGATTGCA-3'
R3710	5'-GTCTACTCTCTCATCCTTG-3'

2.3.7 Quick Change Mutagenese-Primer

Die folgenden Primer wurden für die Generierung von Mutanten via Quick Change Mutagenese verwendet.

Tab. 2. 13: Oligonukleotide für Quick Change Mutagenese.

Name	Nukleotidsequenz
qcAarIT7_fwd	5'-ATCACCTGCTTACTAATACGACTCACTATAGTAAATGAGGATGGCAACGCCATCTTCTGCGTCCTCTGTGCG-3'
qcAarIT7_rev	5'-CGCACAGAGGACGCAGAAGATGGCGTTGCCATCCTCATTACTATAGTGAGTCGTATTAGTAAGCAGGTGAT-3'
qcRsRII_rev	5'-GAGCCCGGCGTGCGGTCCGTCCGGCGTGA-3'
qcRsRII_fwd	5'-TCACGCCGACGGACCGCACGCCGGGCTC-3'

2.3.8 Real-Time RT-PCR Primer

Tab. 2. 14: Oligonukleotide für Real-Time RT-PCR.

Name	Nukleotidsequenz
MNVms-F	5'-GCGCAGCCGATTGACTGT-3'
MNVms-R	5'-GAGCGCGTCCGACTGAA-3'
MNVms-P (Sonde)	5'-TCCTGGTTTGCAAGCAACAACCTCACA-3'
MNVsg_fwd	5'-CCAAGCCAACCTTTCAAGCA-3'
MNVsg_rev	5'-CCTGATGTTGATGCGTTCTC-3'
MNVsg_P (Sonde)	5'-ATGCTTGGCGCCAGGTCCAAG-3'

2.4 Zellen und Virusstämme

2.4.1 Zellen

BHK-J Nierenzellen aus dem Syrischen Goldhamster (*Mesocricetus auratus*)

Klon 13 BHK-21-Derivat

ATCC® Nr. CCL-10™

MEF RIG-I-/ Fibroblastenzellen aus Mausembryos (*Mus musculus*)

MEF RIG-I+ RIG-I Knockout BALB/c-Mäuse

Schenkung von Barchet, Bonn

MEF MDA5-/ Fibroblastenzellen aus Mausembryos (*Mus musculus*)

MEF MDA5+ MDA5 Knockout BALB/c-Mäuse

Schenkung von Barchet, Bonn

RAW 264.7 Maus Monocyten Macrophagen

HPA Culture Collections, Salisbury, UK

2.4.2 Virusstämme

Murines Norovirus, Stamm Berlin EF531291

Fa. Newlab, Köln

Dr. Marcel Asper

2.5 Chemikalien

β-Mercaptoethanol

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Aqua bidest.

Institut für Virologie UK, Bonn

Avicel

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Biozym LE Agarose

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

Bromphenolblau

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Calciumchlorid

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Diethyldicarbonat, (DEPC)

AppliChem, Darmstadt

Dinatriumhydrogenphosphat

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

dNTP Set: dATP, dCTP , dGTP, dTTP (100 mM)

Invitrogen, Karlsruhe

Essigsäure

Merck KGaA, Darmstadt

Ethanol, ≥ 99,5 %

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Ethidiumbromid

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Ficoll® 400

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

GelStar®Nucleic Acid Gel Stain

Lonza, Rockland, USA

Glycerol

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Isopropanol

VWR International, West Chester, USA

Kaliumacetat

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Kaliumchlorid

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Kaliumhydrogencarbonat

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Kanamycin

Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Kohlenstoffdioxid (g)

Linde AG, Pullach

Kristallviolett

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Lambda-DNA

Thermo Scientific, Dreiech

MgCl ₂ 25mM (Expand High Fidelity Enzyme Mix)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
MgCl ₂ 50mM (Phusion® HF DNA Polymerase)	NEB, Frankfurt/Main
MgCl ₂ 50mM (Platinum® <i>Taq</i> DNA Polymerase)	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Na ₂ EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxyd	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nuclease-Free Water	Qiagen, Hilden
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PCR Grade Nucleotide Mix (10 mM dNTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Primer, Sonden	Biomers.net GmbH, Ulm
	Tib-Molbiol, Berlin
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA	PAA, Pasching, Österreich

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Merck (Darmstadt) in Analysenqualität bezogen.

2.6 Kits und Enzyme

2.6.1 DNA-Techniken

2.6.1.1 Restriktionsendonukleasen, DNasen und Phosphatasen

Restriktionsenzyme und -puffer	NEB, Frankfurt/Main
Turbo DNase	Ambion, Huntingdon, U.K.
Antarktische Phosphatase	NEB, Frankfurt/Main

2.6.1.2 Ligation

Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Scientific, Dreieich
------------------------	-----------------------------

2.6.1.3 DNA-Polymerasen

Phusion® Taq DNA-Polymerase	NEB, Frankfurt/Main
Expand High Fidelity Taq Polymerase	Roche, Mannheim
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen, Karlsruhe
MolTaq Polymerase	Molzym, Bremen
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Herculase® II Fusion Enzyme	Statagene, Heidelberg

2.6.1.4 Nukleotide

ATP	Thermo Scientific, Dreieich
dNTPs	Thermo Scientific, Dreieich

2.6.1.5 DNA-Molekulargewichtsmarker

I. 1kb DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
II. 100bp Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
III. 1 kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
IV. Supercoiled DNA Ladder	NEB, Frankfurt

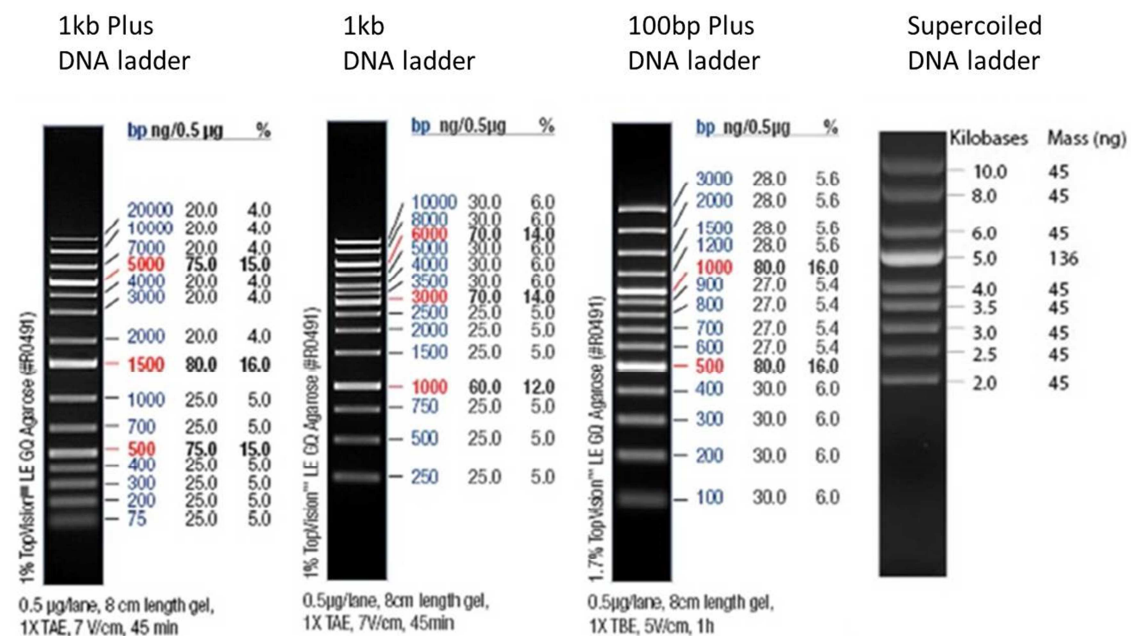


Abb. 2. 1: DNA-Marker

2.6.1.6 DNA-Präparation

Agencourt® AMPure®	Agencourt, Beverly
CloneSmart® LC Kan Cloning Kit	Lucigen, Middleton, USA
ExoSAP-IT For PCR Product Clean-Up	Affymetrix, Buckinghamshire, UK
Nucleobond-AX	Macherey-Nagel (Düren)
Phusion® Site Directed Mutagenesis Kit	NEB, Frankfurt/Main
QIAEX® II DNA Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Midi Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
Seqlab PCR-Reinigungs-Kit	Seqlab GmbH, Göttingen
TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe

2.6.2 RNA-Techniken

2.6.2.1 Reverse Transkription (RT) und RT-PCR

5'/3' RACE Kit, 2nd Generation	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
GeneRacer™ Kit	Invitrogen, Karlsruhe
T7-RNA-Polymerase und 10 x Puffer	Ambion, Huntingdon, U.K.
SuperScriptIII First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript. III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

2.6.2.2 In-vitro Transkription

Megascript® T7 Kit	Ambion, Huntingdon, U.K.
mMESSAGE mMACHINE® (High Yield Capped RNA Transcription Kit)	Ambion, Huntingdon, U.K.

2.6.2.3 RNA-Präparation

QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
TRIZOL® LS Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche, Mannheim
DIG Northern Starter Kit	Roche, Mannheim
DIG Wash and Block Buffer Set	Roche, Mannheim

2.7 Lösungen, Puffer und Medien

Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Roti®-Block	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.7.1 PCR-Puffer

10 x Expand High Fidelity Buffer (15 mM MgCl ₂)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
10 x PCR-Puffer für Mol Taq	Molzym, Bremen
10 x PCR-Puffer für Platinum® Taq (ohne MgCl ₂)	Invitrogen, Karlsruhe
10 x TURBO DNase Buffer	Applied Biosystems, Foster City, USA
5 x First-Strand Puffer (SSII & III)	Invitrogen, Karlsruhe
5 x Phusion® HF Puffer	NEB, Frankfurt/Main

2.7.2 Nährmedien für *Escherichia coli* Stämme Stbl3, TOP10 und MC10-61

LB-Agar (Eigenherstellung)	Nährmedienküche UK, Bonn
- Standardrezeptur - + 5 mg/ml Kanamycin	
LB-Flüssigmedium (Eigenherstellung)	Nährmedienküche UK, Bonn
- Standardrezeptur - + 5 mg/ml Kanamycin	
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe

2.7.3 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Folgende Liste zeigt die für die Zellkultur benötigten Medien und Zusätze:

DMEM, high Glucose (4,5 g/l), mit L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
MEM, with Earle's Salts, ohne L- Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Pasching, Österreich
L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	PAA, Pasching, Österreich
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA)	PAA, Pasching, Österreich
Opti Pro™ SFM (Serum freies Medium)	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe

2.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gel 1 % / 2 %	Institut für Virologie UK, Bonn
1 % / 2 % Agarose H ₂ O	

Ladepuffer 6x (Eigenherstellung)

Institut für Virologie UK, Bonn

0,13 % Bromphenolblau
0,13 % Xylencyanol FF
15 % Ficoll 400
5x TAE-Puffer

TAE-Puffer 50x (Eigenherstellung)

Institut für Virologie UK, Bonn

242 g Tris 100 ml 0,5 M
Na₂EDTA (pH 8,0)
57,1 ml Essigsäure
ad 1 l Aqua bidest.

2.7.5 Protein-biochemische Techniken**2.7.5.1 Lösungen und Puffer****Trenngelpuffer 4x (Eigenherstellung)**

Institut für Virologie UK, Bonn

1,5 M Tris/HCl pH 8,8
0,4 % (w/v) SDS

Sammelgelpuffer 4x (Eigenherstellung)

Institut für Virologie UK, Bonn

0,5 M Tris/HCl pH 6,8
0,4 % (w/v) SDS

APS (Eigenherstellung)

Institut für Virologie UK, Bonn

10 % (w/v) Ammoniumperoxidisulfat
in Aqua bidest.

Laufpuffer (Eigenherstellung)

Institut für Virologie UK, Bonn

50 mM Tris/HCl pH 8,3
384 mM Glycin
0,1 % (w/v) SDS

5 x Laemmli Puffer (Eigenherstellung)

Institut für Virologie UK, Bonn

4 ml 1,5 M Tris/HCl pH 6,8
10 ml Glycerin
5 ml β-Mercaptoethanol
0,4 % (w/v) SDS
1 ml 1 % Bromphenolblau

2.7.5.2 Coomassie-Färbung

SimplyBlue™ SafeStain

Invitrogen, Karlsruhe

2.5.7.3 Polyacrylamidgele und Elektrophoresepuffer

NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm, 12 well

Invitrogen, Karlsruhe

NuPAGE[®] MOPS SDS running buffer

Invitrogen, Karlsruhe

2.7.5.4 Polyklonale Antikörper gegen MNV

Polyklonal; Anti-Kapsid (Kaninchen)

Eurogentec, Köln

Polyklonal; Anti-RdRP (Kaninchen)

Eurogentec, Köln

2.7.5.5 Polyklonale sekundäre Antikörper

Goat-anti-rabbit-HRP

Pierce, Rockford (USA)

2.7.5.6 Protein-Marker

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Fermentas GmnH, St. Leon-Roth

Prestained Protein
Ladder

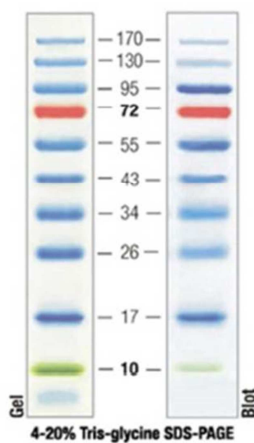


Abb. 2. 2: Protein-Marker

2.7.5.7 Substrate für die Chemilumineszenz

Super Signal® Westo Femto

Thermo Fisher Scientific, Bonn

Super Signal® Westo Femto

Thermo Fisher Scientific, Bonn

2.7.6 Northern Blotting

2.7.6.1 Lösungen und Puffer

1,5 % Agarose Formaldehyd/MOPS Gel Institut für Virologie UK, Bonn

0,75 g Agarose MP
2,70 ml 37 % Formaldehyd
47,30 ml 1x MOPS

RNA Ladungspuffer (Eigenherstellung) Institut für Virologie UK, Bonn

250 µl 100 % deionized Formamid
83 µl 37 % Formaldehyd
50 µl 10x MOPS
10 µl 2,5 % Bromphenol-Blau

SSC Puffer 20x (Eigenherstellung) Institut für Virologie UK, Bonn

800 ml DEPC-H₂O
175,3 g Natriumchlorid
88,2 g Natriumcitrat
pH 7,0
ad 1 L DEPC-H₂O

MOPS Puffer 10x pH 7,0 (Eigenherstellung) Institut für Virologie UK, Bonn

200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA (pH 8,0)

DEPC-H₂O (Eigenherstellung) Institut für Virologie UK, Bonn

0,1 % DEPC
in Aqua bidest.

2.7.6.2 DIG-markierte Sonden

DIG-markierte RNA Sonde β-Aktin Roche, Mannheim

2.7.6.3 DIG Antikörper

Anti-DIG-AP Roche, Mannheim

2.7.6.4 RNA-Marker

RNA molecular weight marker I Roche, Mannheim

RNA molecular weight
marker I (0,3-6,9kb)

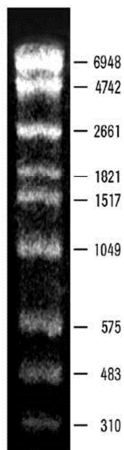


Abb. 2. 3: RNA-Marker

2.7.6.5 Substrat für die Chemilumineszenz

CDP-Star

Roche, Mannheim

2.8 Verbrauchsmaterialien

ABgene PCR Plates (96-well)

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

ABgene Strips of 8 Flat Caps (Natural)

Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

BioMax XAR Film

Kodak, Stuttgart

CryoPure Tubes (1 ml, 2 ml)

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Eppendorf AG Combitips® plus (5 ml, 25 ml)

Eppendorf AG, Hamburg

Elektroporationsküvetten 2mm Gap

VWR, Darmstadt

Filter-Pipettenspitzen für Mikropipetten

≥10, ≥20, ≥100, ≥200, ≥300, ≥1000 µl

Eppendorf AG, Hamburg

≥10, ≥20, ≥100, ≥200, ≥1000 µl

Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf

≥100, ≥200, ≥1000 µl

Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe

Impfösen, soft loop, steril

VWR, Darmstadt

Küvetten UVette® 220 – 1600 nm

Eppendorf AG, Hamburg 2 Material 27

LightCycler® Capillaries (20µl)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Mikro-Schraubrohren 2 ml

PP Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Nylon Membran

Roche, Mannheim

Parafilm® "M" Laboratory Film

Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

Protran Nitrocellulose	Whatman, Dassel
Reaktionsgefäße (0,2 ml)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Reaktionsgefäße 0,5 ml, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml & 2 ml, PP	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße 8er-Stripes (0,2 ml)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen Nerbe plus GmbH, Winsen/Luhe
Westran® S PVDF Membran	Whatman, Dassel
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturpipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellkulturtestplatten (6-, 24-, 96-well)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber (24 cm, 32 cm)	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien

2.9 Technische Geräte

Autoklav, Varioklav 135S	Thermo Fischer Scientific, Bonn
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschrank Galaxy 170 S (CO ₂)	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Brutschrank Heraeus B 6200	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Brutschrank Heraeus HERA cell 240 (CO ₂)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Eismaschine AF 100	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Elektrophorese-System Mini-Trans-Blot	Biorad, Münche
Elektroporationsgerät Gene Pulser und Pulse Controller	Biorad, München
Feather® Disposable Scalpel No. 11	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Federstahlpinzetten, spitz	Fiebig Lehrmittel, Berlin
Filmentwickler Curix 60	Agfa, Bonn
Geldokumentation:	
AlphaDigiDoc™ RT (Alpha Innotech Corp.)	Cell Biosciences Inc., Santa Clara, USA
Olympus Camedia C-5060	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
UV-Tisch AITM-26 (Alpha Innotech Corp.)	Cell Biosciences Inc., Santa Clara, USA
Visi-Blue™ UV Transilluminator	UVP, Cambridge, Vereinigtes Königreich

Gelkämme:

Kamm 1.5 mm/5 Zähne f. Gelsystem Mini	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm 1.5 mm/10 Zähne f. Gelsystem Mini	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm 1.5 mm/20 Zähne f. Gelsystem Maxi	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm 1.5 mm/25 Zähne f. Gelsystem Midi	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kamm ~1 mm/12 Zähne	Eigenkonstruktion UK, Bonn

Gelkammern:

Gelkammer (Eigenkonstruktion)	Washington University, Saint Louis, USA
Owl B2 EasyCast Mini Gel System	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PerfectBlue Gelsystem Maxi S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PerfectBlue Gelsystem Mini S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Glasgeräte

Schott, Mainz

Magnetrührer

VWR International GmbH, Darmstadt

Mikroskopie:

Mikroskop DMLS	Leica, Solms
Mikroskop TCS NT	Leica, Solms
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen

Mikrowelle KOR-6L05

Daewoo Electronics Europe GmbH, Butzbach

pH-Meter, Seven Easy S-20

Mettler-Toledo, Gießen

Pipetten:

Mikroliterpipetten	Eppendorf AG, Hamburg
≥2,5, ≥10, ≥20, ≥100, ≥200, ≥1000 µl	
Eppendorf <i>research plus</i>	
Mehrkanalpipette 30 – 300 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf <i>research plus</i>	
Multipette®plus inkl. 25 ml Tip-Adapter	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhelfer <i>accu-jet® pro</i>	BRAND GmbH & Co. KG, Wertheim
RAININ® LA8-50 8-Kanal verstellbar 5 - 50 µl	Mettler-Toledo GmbH, Giessen

Reagenzglasmixer Vortex

neoLAB GmbH, Heidelberg

Signal-Timer mit Zeituhr

Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Sterile Werkbank *Laminar Flow* Gelaire, BSB4

Flow Laboratories, Merckenheim

Stromquelle *Standard Power Pack P25*

Biometra GmbH, Göttingen

Stromquelle BIO105 LVD	Biometra GmbH, Göttingen
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Thermomixer PHMT SC-18	Grant Instruments Ltd., Shepreth, England
Thermozykler:	
GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer Inc., Rodgau
LightCycler	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Mastercycler® ep <i>gradient</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Mastercycler® <i>pro</i>	Eppendorf AG, Hamburg
Thermal Cycler C1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vortex-Mixer Genie 2	Scientific Industries Inc., New York
Vortex Schüttler VV3	VWR International GmbH, Darmstadt
Waage TP-3002	Denver Instrument, Göttingen
Wasserbad mit Schüttler 1092	GFL mbH, Burgwedel
Wasserbad 1002	GFL mbH, Burgwedel 2 Material 30
Zentrifugen:	
Eppendorf Centrifuge 5430	Eppendorf AG, Hamburg
Ausschwingrotor: A-2-MTP (PCR-Platten)	
Heraeus Biofuge <i>fresco</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sprout™ Mini-Zentrifuge	Heathrow Scientific LLC, Vernon Hills, USA
Tischzentrifuge MIKRO 120	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Avanti®	Beckmann, Krefeld
Rotoren: JA-14; JA-25.50	
Zellzähler	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.10 Software

AlphaDigiDoc RT: AlphaEase® FC Software

BioEdit v7.0.5.3

EndNote® v10.0.2 (Build 2283)

Geneious Pro v4.8.5

Primer3 v0.4.0

ClustalW v2.0.11

GNU Image Manipulation Program v2.6.8

LightCycler Software v3.5.17

NEB Cutters

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

MEGA 5.0

Microsoft Office 2010

NCBI BLAST (blastn/blastx/tblastx)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Oligonucleotide Properties Calculator

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>

Oligonucleotide Properties Calculator

<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>

Cell Biosciences Inc., Santa Clara, USA

Ibis Bioscience, Carlsbad, Canada

Thomson Reuters, New York, USA

Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland

Whitehead Institute, Cambridge, UK

EBI, Cambridge, UK

GIMP Development Team, www.gimp.org

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

New England Biolabs, Frankfurt

Center for Evolutionary Medicine and Informatics, The Biodesign Institute, Tempe, USA

Microsoft Corporation, Redmond, USA

National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA

Feinberg School of Medicine,

Northwestern University, Chicago, USA

GenScript, Piscataway, USA

3. METHODEN

3.1 Kultivierung von Zellen

Bei allen verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Zellen. Die Zelllinien wurden zweimal pro Woche in einem bestimmten Verhältnis in neue Zellkulturflaschen umgesetzt. Nach dem Entfernen des alten Mediums erfolgte das Ablösen der Zellen entsprechend dem Zelltyp entweder mittels eines Zellschabers (RAW264.7) oder durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (Vertebratenzelllinien). Nach Aufnahme der Zellen in frisches Medium und deren Vereinzelung durch wiederholtes Pipettieren der Zellsuspension wurde ein Teil der Zellen entsprechend dem Split-Faktor in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit Medium aufgefüllt. Die Bedingungen, unter denen die Zellen kultiviert wurden, waren 37 °C und 5 % CO₂ sowie eine Luftfeuchtigkeit von >99 %. Wichtige Parameter für die Kultivierung der einzelnen Zelllinien sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3. 1: Parameter für die Kultivierung der Zelllinien.

Zelllinie	Spenderorganismus	Basismedium	Split-Faktor	Begasung	[T °C]
BHK-J	<i>Mesocricetus auratus</i>	MEM	1 : 5	5 % CO ₂	37
MEF MDA5-	<i>Mus musculus</i>	DMEM	1 : 10	5 % CO ₂	37
MEF MDA5+	<i>Mus musculus</i>	DMEM	1 : 10	5 % CO ₂	37
MEF RIG-I-	<i>Mus musculus</i>	DMEM	1 : 10	5 % CO ₂	37
MEF RIG-I+	<i>Mus musculus</i>	DMEM	1 : 10	5 % CO ₂	37
RAW 264.7	<i>Mus musculus</i>	DMEM	1 : 10	5 % CO ₂	37

3.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zahl lebender BHK-J bzw. RAW264.7 Zellen wurden diese mit Trypsin 5 min im Brutschrank inkubiert oder durch Abschaben von der Zellkulturflasche gelöst und anschließend mit einer serologischen Pipette resuspendiert, bis einzelne Zellen vorlagen. Durch Zugabe des doppelten Volumens an FCS-haltigem Medium wurde die Trypsinbehandlung gestoppt. Zur Bestimmung der Zahl an lebenden Zellen wurde die Zellsuspension 1 : 10 in Trypanblau (0,4 % in 1 x PBS) verdünnt. Im Gegensatz zu lebenden Zellen nehmen tote Zellen das Trypanblau auf und färben sich dadurch bläulich. In der Neubauer-Zählkammer wurden die in vier Großquadraten befindlichen, nicht angefärbten Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt und daraus das arithmetische Mittel für ein großes Quadrat bestimmt. Die Berechnung der Zellzahl (Zellen/ml) erfolgte durch folgende Formel: Mittelwert gezählter Zellen x Verdünnungsfaktor x 10⁴ (Kammerfaktor) x Volumen (ml).

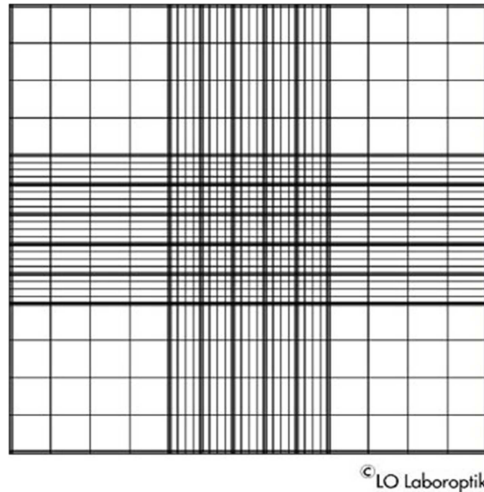


Abb. 3. 1: Neubauer Zählkammer¹

© LO Laboroptik

3.1.2 Elektroporation eukaryotischer Zellen

Die Elektroporation ist eine Methode zur Transfektion von eukaryotischen Zellen. Es handelt sich dabei um die Aufnahme fremder DNA oder RNA in eukaryotische Zellen. Durch einen kurzen elektrischen Impuls wird die Membran der zu transfizierenden Zelle kurzfristig permeabel und die fremde DNA oder RNA kann durch Diffusion in die Zelle gelangen.

Die zu transfizierenden Zellen wurden 24 h vor der Elektroporation in Zellkulturschalen ausgesät und am Tag der Elektroporation zunächst trypsiniert. Die Zellsuspension wurde bei 4 °C, 1200 rpm für 5-10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit Serum-freiem Opti Pro™ Medium (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen. Vor dem zweiten Waschschrift wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in das errechnete Volumen Opti Pro™ Medium aufgenommen, so dass eine Zellkonzentration von 2×10^7 Zellen/ml für die Elektroporation gegeben war. Die Zellen wurden zunächst auf Eis gestellt. Die RNA (0,2 – 5 µg) wurde in einem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit 50 µl Opti Pro™ Medium vermischt. Dazu wurden 50 µl der zuvor eingestellten Zellsuspension gegeben und alles vermischt und in die Elektroporationsküvette (Spaltdicke 2 mm) überführt. Nach Einführen der Küvette in den Elektroporator Gene Pulser (Biorad, München) wurden die Zellen einem elektrischen Impuls ausgesetzt und daraufhin 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die elektroporierten Zellen konnten nun mit einer Pasteur-Pipette aus der Küvette entnommen und in eine T25 Zellkulturflasche mit dem üblichen Standardmedium überführt werden.

Zur Regeneration der Zellen blieb der Transfektionsansatz für 24 h im Brutschrank. Die Auswertung erfolgte über Titration auf RAW264.7 Zellen. Der Transfektionsansatz wurde bei -80 °C eingefroren,

¹ http://zaehlkammer.de/gfx/neubauer_improved.jpg Zugriff erfolgte am 06.07.2012

um so ein „Aufknacken“ der Zellen zu erzielen und Virus-RNA freizusetzen. Die „freeze and thaw“ Methode wurde jeweils dreimal wiederholt, bevor die Zellsuspension mittels Plaque-Assay (3.1.6) quantifiziert wurde.

<u>Elektroporator-Einstellung:</u>	Spannung	140 Volt
	Impulsdauer	25 Millisekunden
	Impuls(e)	1

3.1.5 Virus-Infektion eukaryotischer Zellen und Ernte von Viren

Die Infektion eukaryotischer Zellen mit infektiösen Viruspartikeln diente der Virus-Vermehrung oder der Überimpfung eines zytopathischen Effektes. Die Viren können durch Abnahme des Zellkulturüberstands gewonnen werden. Um Zellrückstände aus dem Überstand zu entfernen, wurden diese als Pellet vorher abzentrifugiert. Die Viruspartikel verblieben im Überstand. Aus den Überständen der Infektion konnte virale RNA extrahiert werden (3.5.4.2).

Einen Tag vor Infektion wurden pro Infektion $1,5 \times 10^6$ RAW264.7 Zellen/Well in einer 6-Well-Zellkulturplatte eingesät. Bei Virus-Suspensionen mit bekannten Titern konnte mit einer bestimmten „multiplicity of infection“ (MOI) infiziert werden. Eine MOI von 1 bedeutet, dass pro Zelle im Well ein Viruspartikel zugesetzt wird. Die Virus-Suspension wurde in Serum-freien Opti Pro™ Medium (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt, so dass das Endvolumen 500 µl entsprach. Das gesamte Volumen wurde nach Abnahme des Mediums in das „Well“ gegeben und 1 Stunde bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, mit dem üblichen Standardmedium versetzt und zurück in den Brutschrank gestellt. Nun konnte an bestimmten Zeitpunkten Überstand abgenommen werden.

3.1.6 Virus-Titration und Plaque-Assay

Die Titration ermöglicht die Bestimmung der Viruspartikelkonzentration einer Virus-Suspension, meist Zellkulturüberstand. Zu definierten Zeiten abgenommene Zellkulturüberstände einer Infektion konnten titriert werden, um die Viruspartikelkonzentration zur Erstellung einer Wachstumskurve zu ermitteln.

Einen Tag vor der Titration wurden $1,5 \times 10^6$ RAW264.7 Zellen/Well in 6-Well Zellkulturplatten eingesät. Zur Titration wurden 50 µl der Virussuspension mit 450 µl Serum-freien Opti Pro™ Medium (Invitrogen, Karlsruhe) verdünnt (Verdünnungsfaktor 1 : 10). Aus dieser Verdünnung wurden

wiederum 50 µl entnommen und in 450 µl Opti Pro™ gegeben (Verdünnungsfaktor 1 : 100). Durch Fortsetzen dieser Verdünnung wurde eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten angesetzt. Nach Abnahme des Mediums in den Wells wurden jeweils 400 µl geeignete, aufeinanderfolgende Verdünnungsstufen in die ersten fünf Wells der Zellkulturplatte gegeben. Das sechste Well diente als Kontrolle und wurde mit 500 µl Opti Pro™ Medium versehen. Es folgte eine Stunde Inkubationszeit bei 37 °C im CO₂-Brutschrank zur Infektion der Zellen.

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 2 ml Avicel-Overlay (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) bestehend aus Avicel (2,4 %) und 2 x MEM im gleichen Verhältnis überschichtet. Alternativ wurde ein Agarose-Overlay aus Agarose (1,2 %) und 2 x MEM im gleichen Verhältnis zur Überschichtung verwendet. Anschließend wurden die Zellkulturplatten für drei Tage bei 37 °C in den CO₂-Brutschrank gestellt. Nach dieser Zeit wurden die Zellen mindestens 30 min in einem Formaldehyd-Bad (6 %) fixiert. Nach dem Waschen unter fließendem kalten Wasser erfolgte die Kristallviolett-Färbung (1 % Kristallviolett in 20 % Ethanol) für 6 h. Die Kulturplatten wurden erneut gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plaques wurden gezählt, um die Viruspartikelkonzentration der aufgetragenen Probe nach unten stehender Formel zu bestimmen.

$$\text{Anzahl Plaques im Well} \times 5 \times 10^{\text{Verdünnungsstufe}} = \text{PFU/ml}$$

<u>2 x MEM:</u>	NaHCO ₃	2,2 g
	FCS (4 %)	20 ml
	Penicillin (5000 U/ml) Streptomycin (5000 µg/ml)	10 ml
	MEM	9,78 g
	H ₂ O	ad 500 ml

3.1.7 Immortalisierung von MEFs

Die Immortalisierung von Maus-Primärzellen erfolgte über eine lentivirale Transduktion des großen T-Antigens von Simian Virus 40 [158]. Ein Well einer 6-Well-Platte wurde dafür mit ca. 100.000 – 200.000 Zellen und 800 µl DMEM versetzt. Die Lentiviren wurden mit einer MOI von 10 zugegeben und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Well mit DMEM auf 2 ml aufgefüllt. Die Zellen konnten anschließend passagiert bzw. subkloniert werden.

3.1.8 Subklonierung von MEFs

Für die Subklonierung der Mausfibroblasten wurden zunächst 10.000 Zellen in 10 ml Selektionsmedium aufgenommen, so dass eine Konzentration von 100 Zellen in 100 µl Medium vorherrschte. Davon wurden jeweils 200 µl in die oberste Reihe einer 96-Well-Platte gegeben und der Rest der Platte mit 100 µl Selektionsmedium gefüllt. Von der obersten Reihe A beginnend wurden die Zellen seriell 1 : 2 bis zur untersten Reihe H verdünnt (d.h. 100 bzw. 50 Zellen befanden sich in der obersten Reihe, 50 bzw. 25 Zellen in der 2. Reihe usw.). Während einer Inkubationszeit von 7 Tagen bei 37 °C im Brutschrank wurden erkennbare Einzelklone in den Reihen F, G, H markiert (Abbildung 3.2). Nach weiteren 14 bis 21 Tagen, je nach Wachstum, wurden die Zellklone durch Abschaben oder Trypsinieren in 24-Well-Platten überführt. Nach weiterem Expandieren von jeweils vier morphologisch unterschiedlichen Klonen im Selektionsmedium und ELISA-Tests konnten die positiven Klone schließlich in flüssigem Stickstoff eingefroren werden.

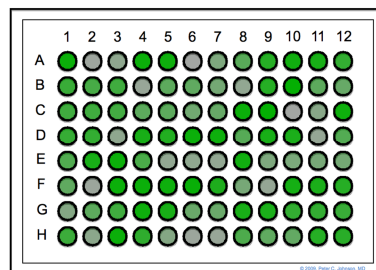


Abb. 3. 2: Schema einer 96-Well-Platte²

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Anzucht von Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme von *Escherichia coli* wurden bei 37 °C unter Schütteln in sterilem Luria-Bertani-Medium (LB) angezogen. Um Plasmid-haltige Bakterien zu selektieren und anschließend zu expandieren, wurden aufgrund der höheren Vektorstabilität ausschließlich LB-Agar-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml) verwendet.

LB-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O	ad 1 l

²http://88proof.com/synthetic_biology/blog/wp-content/uploads/2009/11/ElisaRedux_finals.png
Zugriff erfolgte am 25.07.2012

3.2.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien wurde die Bakterienzellwand durch Behandlung mit Calciumchlorid für Nukleinsäuremoleküle permeabilisiert. LB-Medium (250 ml) wurde mit 0,5 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli* Stammes angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,6 - 0,7 angezogen. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 4 °C und 8000 x g für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml kalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und anschließend weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5 min bei 4 °C wurden die Bakterienzellen in 2,5 ml kalter 0,1 M $CaCl_2$ -Glycerinlösung (85 : 15) aufgenommen, in vorgekühlten Reaktionsgefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die nun transformationskompetenten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.2.3 Transformation von Plasmid-DNA in $CaCl_2$ -kompetente Bakterien

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot transformationskompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 450 µl kalter 0,1 M $CaCl_2$ -Lösung versetzt. 100 µl dieses Ansatzes wurden mit einem Ligationsansatz (3.4.3) bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA vermischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s im Thermomixer. Anschließend wurde die Probe kurz auf Eis abgekühlt, mit 200 µl LB-Medium versetzt und 60 min bei 37 °C unter Schütteln mit 300 rpm inkubiert. Danach wurde der gesamte Transformationsansatz (bei einer Re-Transformation von Plasmid-DNA nur ¼ der Probe) auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen und für ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Zur Anzucht wurde 1/4 bzw. 1/8 einer LB-Agar-Platte mit einer gewachsenen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Bakterienbrutschrank kultiviert.

3.3 DNA-Techniken

3.3.1 Plasmid-Isolierung im kleinen Maßstab (Mini-Präparation)

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Standardprinzip der alkalischen Lyse unter Verwendung des QIAprep® Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden). Alle Zentrifugationen fanden, wenn nicht anders erwähnt, bei 16.000 x g und Raumtemperatur statt. Zunächst wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 1 min abzentrifugiert bzw. 1/4 einer dicht bewachsenen LB-Agar-Platte mit einem Zellschaber isoliert. Das Bakterienpellet wurde durch Vortexen in 250 µl Puffer 1 resuspendiert, mit 250 µl Puffer 2 versetzt und durch Invertieren vorsichtig vermischt. Nach 5-minütiger Lyse bei Raumtemperatur wurde der alkalische Ansatz mit 350 µl Puffer N3 neutralisiert. Leichtes Schütteln erzeugte einen Niederschlag aus bakteriellen Proteinen und chromosomaler DNA, der durch ein 10-

minütiges Zentrifugieren pelletiert wurde. 750 µl des klaren Überstands wurden auf die mitgelieferte Extraktionssäule überführt. Nach 1-minütiger Zentrifugation wurde das Eluat verworfen und die Säule mit jeweils 500 µl PB Puffer und 750 µl PE Puffer sequentiell gewaschen. Die Elution erfolgte mit 60-80 µl des zuvor auf 80 °C erhitzten Elutionspuffers EB. Die Qualität und Quantität der Plasmid-DNA wurden durch photometrische Bestimmung sowie einem Restriktionsverdau mit anschließender Elektrophorese im Agarosegel überprüft.

3.3.2 Plasmid-Isolierung im mittleren Maßstab (Midi-Präparation)

Größere Plasmidpräparationen wurden mit dem Qiagen® Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (50 ml bei high-copy, 100 ml bei low-copy Plasmiden) und das Pellet in 4 ml bzw. 7 ml Puffer 1 resuspendiert. Es wurden 4 ml bzw. 7 ml Puffer 2 zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 5 min wurde die Lyse durch Zugabe von 4 ml bzw. 7 ml kaltem Puffer 3 abgestoppt. Nach leichtem Schütteln wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Um die DNA-haltige Flüssigkeit von den gefällten Proteinen zu trennen, wurde die klare Suspension über einen Filter in die mit Puffer QBT equilibrierte Säule pipettiert. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 10 ml Puffer QC wurde die DNA durch Zugabe von 5 ml Puffer QF eluiert. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und 30-minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g und 4 °C wurde die Plasmid-DNA präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 2 ml 70 %-igem Ethanol wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, anschließend in 50 µl Aqua dest. bzw. Elutionspuffer aufgenommen und nach der Quantität- und Qualitätsbestimmung im UV-Spektrophotometer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

3.3.3 Aufreinigen von DNA

Eine Aufreinigung von DNA ist häufig notwendig, um störende Komponenten, wie denaturierte Polymerasen, Primer und vor allem Salze zu entfernen, die im Folgenden eine Reaktion beeinträchtigen könnten.

3.3.3.1 Aufreinigen von PCR-Produkten

Für die Sequenzierung wurden die PCR-Produkte im Voraus aufgereinigt. Häufig wurde dafür das SeqLab PCR-Reinigungs-Kit verwendet, das unter anderem durch die Verwendung von Affinitätssäulen eine Aufkonzentration des PCR-Produktes durch ein minimales Elutionsvolumen von 10 µl erlaubt. Die Elution wurde dabei stets in dem mitgelieferten Elutionspuffer durchgeführt. Da ein Nachteil der Affinitätssäulen der Verlust von einem gewissen Anteil an PCR-Produkt darstellt,

wurde in Fällen von geringer PCR-Produkt-Konzentration (Abschätzung anhand des Agarose-Gelbildes möglich) das ExoSAP-IT For PCR Product Clean-Up Kit (Affymetrix, Buckinghamshire) nach Herstellerangaben verwendet. Die Enzymkombination aus diesem Exonuclease-Phosphatase-Verdau befreit PCR-Ansätze von großen Mengen an Primern und Nukleotiden ohne Materialverlust. Es bleiben jedoch denaturierte Enzyme, Primerdimere, wie auch die Pufferbedingungen - und damit Salze - erhalten. Zu 5 µl PCR-Produkt wurden 2 µl ExoSap pipettiert und vermischt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte bei 37 °C für 15 min, gefolgt von einem anschließenden Inaktivierungsschritt der Enzyme bei 80 °C für 15 min.

Eine weitere Möglichkeit zur Aufreinigung von DNA in Form von PCR-Amplifikaten stellte das Agencourt® AMPure® System der Fa. Beckman Coulter dar. Mit dieser Methode wird ein effizientes Beseitigen von dNTPs, Salzen, Primern und anderen Störstoffen erzielt, bei einer gleichzeitig hohen Ausbeute an PCR-Fragmenten. Abbildung 3.3 zeigt einen Überblick der Funktionsweise.

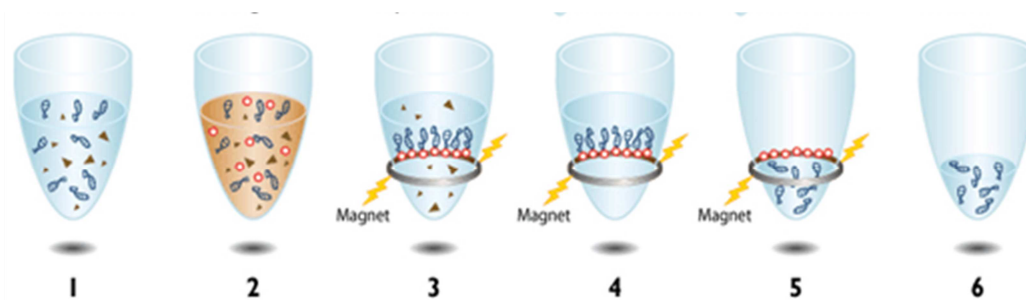


Abb. 3. 3: Ampure® PCR-Produkt Aufreinigung³.

Modifiziert nach der Beckman Coulter Genomics Gebrauchsanleitung. Gezeigt ist das Funktionsprinzip der Ampure PCR-Produkt Aufreinigung. 1. PCR-Reaktion 2. Bindung der PCR-Amplifikate an magnetische „beads“ 3. Abtrennung der an magnetischen „beads“ gekoppelten PCR-Amplifikate von Fremdstoffen 4. Waschschriff mit Ethanol 5. Elution der PCR-Amplifikate von den magnetischen Partikeln 6. Transfer in ein neues Reaktionsgefäß.

3.3.3.2 Phenol-Chloroform-Extraktion mit Ethanolfällung

Zur Aufkonzentrierung von DNA, Abtrennung von Proteinen oder Veränderung der Pufferbedingungen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Natriumacetat-Ethanolfällung durchgeführt. Ein Minimum von 100 µl der wässrigen Nukleinsäurelösung wurde mit einem Volumen Phenol ausgeschüttelt. Für 2 min erfolgte bei 16.000 x g die Phasentrennung. Die obere, nukleinsäurehaltige, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die obere Phase in

³http://www.beckmangenomics.com/products/dna_purification_and_cleanup/agencourt_ampure_xp.html
Zugriff erfolgte am 14.07.2012

ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch eine anschließende Ethanolfällung wurde die Nukleinsäure weiter gereinigt und konzentriert.

3.3.3.3 Ethanolfällung von DNA

DNA-Amplifikate sowie zirkuläre und restringierte Plasmid-DNA wurde mit $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetatlösung (pH 7,0) und einem 2,5-fachen Volumen an absolutem Ethanol vermischt und für 30 min bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Anschließend wurde die DNA bei $16.000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pelletiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde mit $200\text{ }\mu\text{l}$ 70 %-igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in einem adäquaten Volumen Aqua dest. oder Elutionspuffer EB aufgenommen.

3.3.3.4 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels des QIAEX® II DNA Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Bindung von Nukleinsäuren an Silikapartikel [159]. Gewünschte DNA-Fragmente wurden aus einem präparativen Agarosegel unter UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt, wo sie in einer adäquaten Menge an Puffer QX1 in Anwesenheit der QIAEX® II Suspension gelöst wurden. Die Nukleinsäure wurde im Thermomixer bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 1000 rpm an die Silikapartikel gebunden und nach seriellen Waschschritten mit den Puffern PB und PE in Aqua dest. oder Elutionspuffer EB je nach Fragmentgröße bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ bzw. bei Raumtemperatur gelöst. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei $14.000 \times g$ wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.3.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrationsbestimmung einer Nukleinsäurelösung erfolgte durch Messung der OD bei 260 nm gegen Aqua dest.. Bei doppelsträngiger DNA gilt folgende Formel:

$$\text{DNA-Konz. } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 0,05$$

Der Quotient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gibt Aufschluss über Proteinkontaminationen in der Lösung. Bei einem Quotienten von 1,8 - 2,0 liegen keine derartigen Verunreinigungen vor, ansonsten ist der Quotient deutlich niedriger [160].

3.3.5 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Agarose

Eine weitere Möglichkeit Nukleinsäure zu quantifizieren bietet das Agarosegel. Dessen Nachweisgrenze liegt bei etwa 5 ng DNA pro Bande. Dafür wurde ein Aliquot zu quantifizierender DNA mit einem DNA-Größenmarker aufgetragen und über einen Vergleich der Bandenintensitäten die Konzentration abgeschätzt. Diese Methode eignet sich besonders für kleine DNA-Mengen, um eine Idee von den Größenordnungen zu bekommen, ohne die gesamte Menge DNA für die photometrische Messung zu verbrauchen.

3.3.6 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Bei einer DNA-Restriktion ermöglichen Restriktionsendonukleasen die Spaltung von DNA an spezifischen Nukleotidsequenzen, der sog. Erkennungssequenz. Je nach Enzym entstehen glatte Enden (blunt-ends) oder überhängende Enden (sticky-ends).

Diese Typ II Restriktionsendonukleasen stammen aus Bakterien, wo sie zur Abwehr fremder DNA dienen. Die Methode dient der Analyse von Plasmiden oder zur Klonierung.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und -puffer wurden von der Fa. NEB bezogen und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

Standardprotokoll für einen Restriktionsansatz:

Inkubation: 1-3 Stunden / über Nacht

DNA	1-3 µg
Restriktionsendonuklease	0,7 µl
10x Restriktions-Puffer	3 µl
100x BSA (10 mg / ml)	0,3 µl
H ₂ O	ad 30 µl

3.3.7 Herstellung glatter Enden an DNA-Molekülen

Für die Ligation nicht kompatibler Enden nach Restriktionsenzymspaltung ist es notwendig, glatte Enden herzustellen. Hierzu wurde das große Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aus *E. coli* verwendet. Dieses füllt 5'-überstehende, einzelsträngige DNA-Sequenzen nach Restriktionen auf (Polymerasefunktion) und baut 3'-überstehende, einzelsträngige DNA-Sequenzen nach Restriktionen ab (Exonukleasefunktion). Somit erzeugt es glatte Enden (blunt-ends) bei DNA-Fragmenten. Zu einem präparativen Restriktionsansatz wurden 1 U / µg DNA des Klenow-Fragments zugefügt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubationszeit wurden 0,75 µl dNTPs (5 mM) zugegeben und 15 min bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung des Ansatzes wurde eine Ethanolfällung der DNA durchgeführt.

<u>1 x Klenow Puffer:</u>	10 mM Tris-HCl
	50 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	1 mM Dithiothreitol

3.3.8 Dephosphorylierung

Um eine Selbstligation (Re-Ligation) von geschnittenen DNA-Fragmenten zu verhindern, wurden bei der Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten die freien 5'-Phosphatgruppen mittels einer Phosphatase hydrolysiert. Bei Klonierungen wurde der Vektor mit Phosphatase behandelt. Dazu wurde 1 µl Antarktische Phosphatase (NEB, Frankfurt/Main) pro 1 µg DNA verwendet. Das Enzym wurde dem Restriktionsansatz direkt nach erfolgter Spaltung zugesetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Inkubation bei 65 °C für 5 min gestoppt. Die DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanolfällung (3.3.3.2) gereinigt.

3.3.9 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wird als Standardmethode zur Trennung, Identifizierung und Reinigung von DNA-Fragmenten eingesetzt.

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8 – 1,5 %-ige Agarosegele verwendet. Die DNA ist aufgrund der Gesamtladung des Moleküls ein Poly-Anion und trägt somit eine negative Ladung. Im elektrischen Feld wandert DNA daher zum positiven Pol. Die Matrix des Agarose-Gels bremst bei diesem Lauf die DNA: Kleine DNA-Moleküle wandern schneller durch das Gel als große. Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, wird ein Phenanthridin-Farbstoff, das Ethidiumbromid, verwendet. Einzelne Ethidiumbromid-Moleküle interkalieren selbstständig zwischen den Basen der DNA. Dabei ändert sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid so, dass die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. Dabei ist die Intensität des abgestrahlten Lichtes proportional zur Menge DNA.

Zur Herstellung der Gele wird die gewünschte Menge Agarose-Pulver mit einer entsprechenden Menge 1x TAE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis es sich vollständig gelöst hat. Anschließend wird Ethidiumbromid zugegeben (Endkonzentration 0,2 µl/ml), die Lösung geschwenkt und in die vorbereitete Gelelektrophoresekammer gegossen. Über einen eingesetzten Kamm bilden sich nach der Polymerisation des Gels kleine Taschen, in die die DNA-Proben, 1 : 6 versetzt mit Ladepuffer (6x), aufgetragen werden. Parallel wird ein Marker aufgetragen, der Nukleinsäurefragmente bekannter Größe enthält und später als Größenvergleich dient (2.6.1.5).

Die bereits beschriebene Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt abhängig von der Gelgröße bei 120 bis 300 V für 20 bis 40 min. Die Darstellung und digitale Dokumentation der DNA-Fragmente fand letztendlich auf einem Transilluminator unter UV-Licht statt. Anhäufungen von DNA-Fragmenten einer Größe erscheinen dabei als sog. „Banden“ im Gelbild.

3.4 Klonierungsmethoden

3.4.1 Klonierung in den pCR[®]4-TOPO[®] Vektor

Taq DNA-Polymerasen besitzen eine Matrizen unabhängige Transferaseaktivität, die bei amplifizierten DNA-Fragmenten zu einem 3'-Überhang führen, welcher aus einem einzelnen Desoxyadenosin besteht. Der linearisierte pCR[®]4-TOPO[®] Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) besitzt am 3'-Ende ein Desoxythymidin, das mit einer Topoisomerase konjugiert ist, die die Ligation katalysiert. Die Selektion von Rekombinanten erfolgt über die durch die Insertion vermittelte Fragmentierung des letalen *E. coli*-Gens *ccdB* [161]. Nur bei einer Insertion eines DNA-Fragments in den Vektor wird das *ccdB* Gen nicht exprimiert. Nach der Inkubation des folgenden Ligationsansatzes für 20 min bei Raumtemperatur wurde ein 3 µl Aliquot in One Shot[®] Top10 *E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe) durch einen Hitzeschock für 45 s bei 42 °C transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin (5 mg/ml) als Selektionsantibiotikum ausplattiert.

Ligationsprotokoll für die TA-Klonierung:

4,5 µl	PCR-Produkt
1 µl	Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,006 M MgCl ₂)
1 µl	pCR4 [®] TOPO [®] Vektor

3.4.2 Klonierung in den pSMART[®] LCKan Vektor

Bei der CloneSmart Ligation in den pSMART[®] LCKan Vektor (Lucigen, Middleton) wird ein blunt-end restringierter und phosphorylierter Vektor verwendet. Das zu inserierende DNA-Fragment weist ein phosphoryliertes blunt- 5'-Ende auf. Im Folgenden ist das Protokoll für die Ligationsreaktion dargestellt.

Ligationsprotokoll für die pSMART[®]-Klonierung:

6,5 µl	Insert DNA (200 ng, <i>blunt-end</i> , 5'-phosphoryliert)
2,5 µl	4x CloneSmart Vektor Premix (pSMART [®] Vektor, ATP, Puffer)
1,0 µl	CloneSmart [®] DNA Ligase (2U/µl)

Der Ligationsansatz wurde anschließend für 30 bis 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Denaturierung der Ligase für 15 min bei 70 °C im Thermomixer wurden 4 µl in One Shot® Stbl3™ *E. coli*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert und auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin (5mg/ml) als Selektionsantibiotikum ausplattiert.

3.4.3 Ligation mit der T4 DNA-Ligase

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert unter ATP - Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxylende von DNA-Fragmenten, die z.B. durch Restriktion entstanden sind. Für die Ligation wurde das „Rapid DNA Ligation Kit“ der Fa. Thermo Scientific (Dreieich) verwendet. Vektor und Insert wurden in einem Verhältnis von etwa 1 : 3 im Ligationsansatz eingesetzt; die Menge der einzusetzenden Fragmente wurde über Agarose-Gelelektrophorese (3.3.9) abgeschätzt. Um zu kontrollieren, ob der Vektor re-ligiert, wurde eine sog. Vektorkontrolle angesetzt, die das Insert nicht enthält. Die gesamten Ligationsansätze wurden nach einer Inkubationszeit von 10-30 min bei Raumtemperatur für die Transformation CaCl₂-kompetenter Zellen verwendet und auf LB-Agar-Platten mit Kanamycin (5mg/ml) als Selektionsantibiotikum verwendet.

Ligationsprotokoll für T4-DNA-Ligase:

2,0 µl	5 x Rapid Ligation Buffer
0,5 µl	T4-Ligase
x µl	Vektor
3x µl	Insert-DNA
ad 10 µl	H ₂ O

Vektorkontrolle:

2,0 µl	5 x Rapid Ligation Buffer
0,5 µl	T4-Ligase
x µl	Vektor
ad 10 µl	H ₂ O

3.4.4 Polymerase chain reaction (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden, bei der es zu einer selektiven Vervielfältigung von DNA-Abschnitten kommt, die von spezifischen Primern flankiert sind [162]. Der komplementäre Einbau von frei vorliegenden Nukleotiden (nt) in diesem Bereich wird von einer besonders hitzestabilen Polymerase durchgeführt. Ein zyklischer Wechsel zwischen Denaturierungs-, Bindungs- (Annealing-) und Extensionstemperatur sorgt für eine im Idealfall exponentielle Amplifikation der Zielsequenz. Das Protokoll und der Reaktionsansatz sind dabei abhängig von der verwendeten Polymerase und dem Anwendungsziel.

3.4.5 Gerichtete Mutagenese

Eine Mutagenese ist die molekularbiologische Methode zur Erzeugung von Mutationen im Erbgut. Ziel der gerichteten Mutagenese ist es, in ein DNA-Fragment innerhalb eines Plasmids gezielte, ortsspezifische Mutationen einzuführen. Dies erfolgte über Mutagenese-Primer in einer Extensions-PCR oder mit dem QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit der Fa. Stratagene (Heidelberg).

Bei der Extensions-PCR werden zunächst zwei getrennte PCRs durchgeführt, bei der Produkte entstehen, die einen endständigen, überlappenden Sequenzbereich aufweisen. Dieser identische Sequenzbereich enthält die Mutation, die über die gewählten Mutagenese-Primer in das PCR-Produkt eingefügt wurden. In einem zweiten Schritt wird eine PCR durchgeführt, in die als Template-DNA die beiden PCR-Produkte mit überlappendem Sequenzbereich gegeben werden. Als Primer bei dieser Extensions-PCR dienen die beiden Primer, die nicht die Mutation tragen. Das Ergebnis ist ein Fusionsprodukt aus den beiden PCR-Fragmenten, das nun in dem zuvor überlappenden Sequenzbereich die Mutation aufweist. Über die Primer, die keine Mutation enthalten, können dem entstehenden Fusionsprodukt zur weiteren Verwendung endständige Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen für eine Klonierung oder andere funktionelle Sequenzen, wie ein Startcodon, angehängt werden. Das Funktionsprinzip der gerichteten Mutagenese über Extensions-PCR ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Diese Methode diente vor allem zur Erzeugung der subgenomischen Promotormutanten.

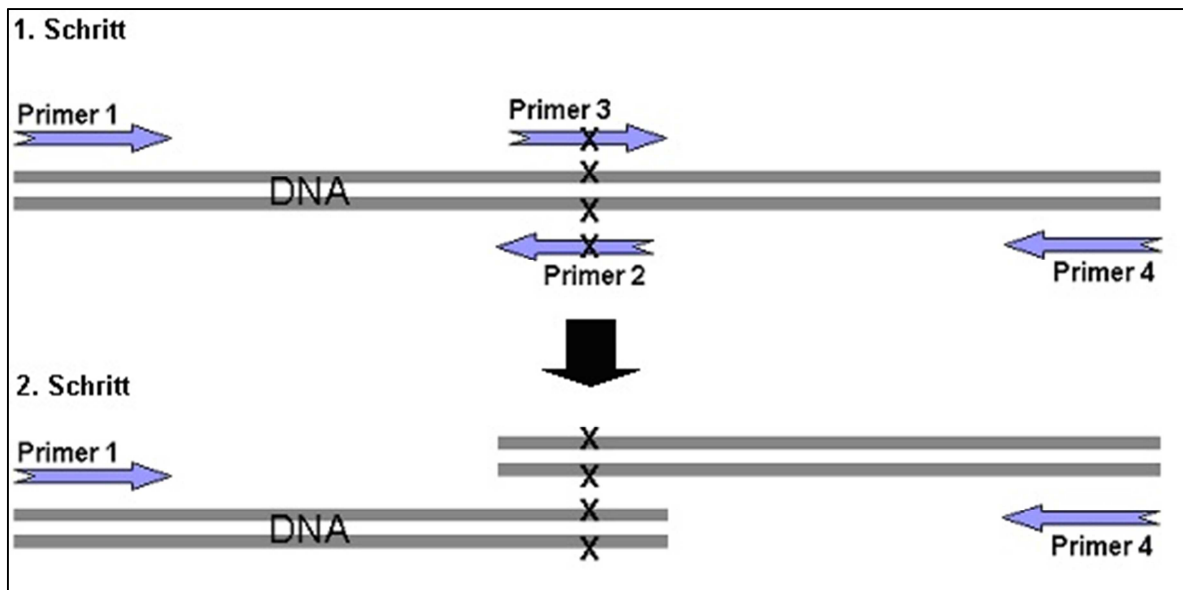


Abb. 3. 4: Funktionsprinzip der Extensions-PCR.

Gezeigt ist das Funktionsprinzip der Extensions-PCR. Über die Primer 2 und 3 können gewünschte Mutationen in das PCR-Produkt eingebracht werden (X = Ort der Mutation). Im ersten Schritt werden zwei getrennte PCRs (eine mit den Primern 1 und 2, die andere mit Primern 3 und 4) mit überlappendem Bereich, der die Mutation enthält, angesetzt. Im zweiten Schritt der Extensions-PCR wird ein Fusionsprodukt der beiden PCR-Produkte des ersten Schrittes mit den Primern 1 und 4 amplifiziert. Das Fusionsprodukt enthält die gewünschte Mutation.

Bei kleineren Plasmiden bis zu einer Größe von 8000 bp konnte das QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers verwendet werden (Abbildung 3.5). Die Mutagenese erfolgte durch zwei Primer, die jeweils die Mutation enthielten. Beide Plasmidstränge wurden mit der PfuUltra™ high fidelity DNA-Polymerase in einer 50 µl Standardreaktion (Tabelle 3.2) amplifiziert. Die Pfu-Polymerase besitzt Proofreading Aktivität. Nach der DNA-Amplifikation wurde die Reaktion auf einem 1 % Agarose-Gel überprüft. War die Amplifikation erfolgreich, konnte nun die bakterielle Template-DNA durch Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* (NEB, Frankfurt/Main) verdaut werden. Das Enzym arbeitet dabei methylierungsabhängig, d.h. es wird nur die methylierte bakterielle DNA (das nicht mutierte Originalkonstrukt), nicht aber die nicht methylierte neu synthetisierte DNA geschnitten. Die durch die Amplifikation hergestellte DNA bleibt erhalten, da Methylierung nur in Bakterien auftritt. Nach einer Phenol-Chloroform-Aufreinigung wurde die restringierte Plasmid-DNA in One Shot® Stbl3™ *E. coli*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert (3.2.3) und auf LB-Kanamycin-Platten ausgestrichen. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden mit einer Impföse zur Expansion auf eine neue Platte ausgestrichen, so dass am Folgetag die Plasmid-DNA isoliert werden konnte (3.3.1). Schließlich wurde die erfolgreiche Insertion der gewünschten Mutation durch Sequenzierung (3.4.7) bestätigt.

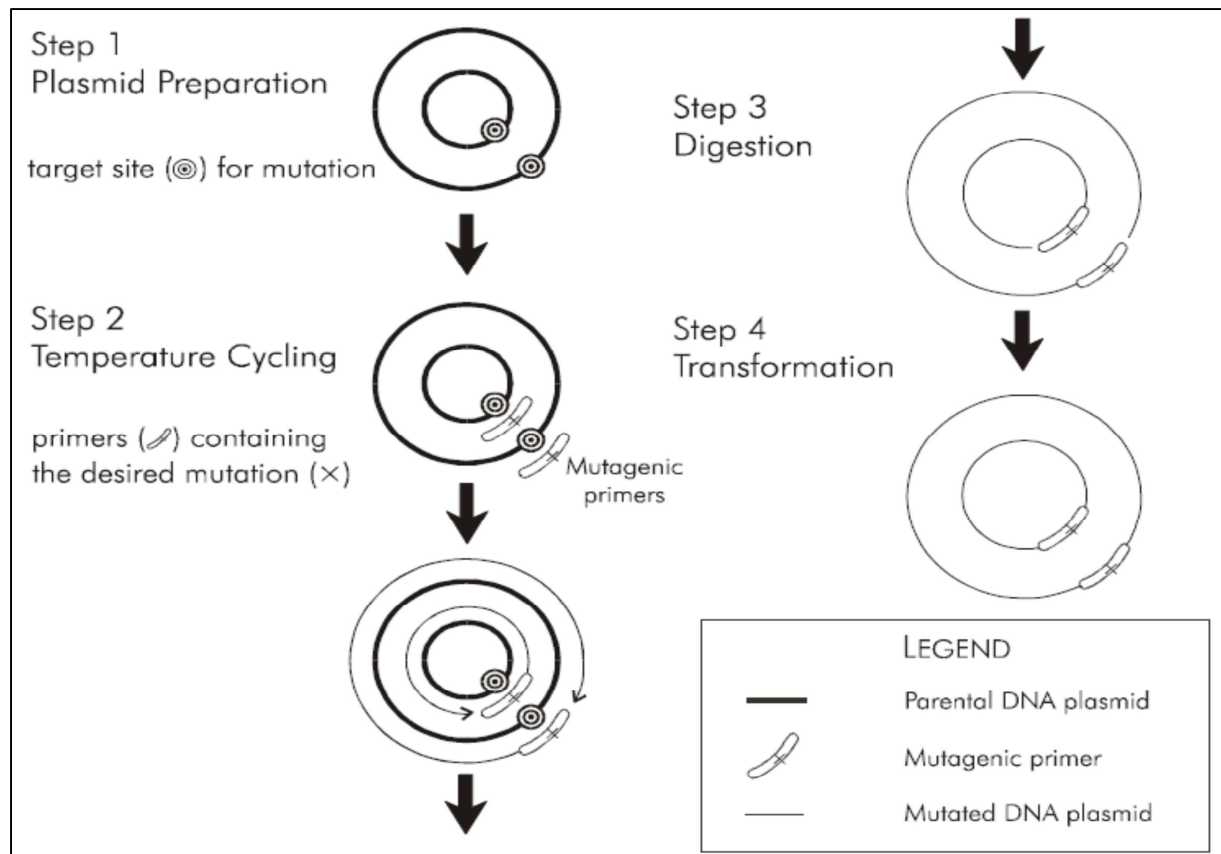


Abb. 3.5: Funktionsprinzip der „QuickChange Mutagenese“ (modifiziert nach der Stratagene Gebrauchsanleitung). Gezeigt ist die Funktionsweise der „QuickChange Mutagenese“. Das Template-Plasmid mit der Mutagenese-Zielsequenz wird in einer PCR mit Mutagenese-Primern zu gebrochenen Einzelsträngen amplifiziert. Es folgt durch *DpnI* der Abbau der methylierten Template-Plasmide. Das unmethylierte Mutagenese-Produkt wird in kompetente Bakterienzellen transformiert. Aus den Zellen lassen sich intakte, mutierte Plasmide isolieren.

Tab. 3. 2: Standardprotokoll QuickChange-Mutagenese.

Mix:		Cycler-Programm:	
10x Reaktionspuffer	5 µl	95°C	60 s
DNA-Matrize (Plasmid)	10 ng	12-18 x	
sense Primer	125 ng	95°C	50 s
antisense Primer	125 ng	60°C	50 s
dNTP-Mix	1 µl	68°C	60 s/kb
Quick-Solution	3 µl		
H ₂ O	ad 50 µl		
<i>PfuUltraTM high fidelity</i>	1 µl	68°C	420 s
DNA-Polymerase		4°C	∞

3.4.6 Direkter PCR – basierter Nachweis von Plasmiden (Kolonie-PCR)

Zur direkten Analyse von Plasmiden aus Bakterienkolonien wurden letztere mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen. Die Bakterien wurden jeweils in 200 µl Aqua dest. resuspendiert und anschließend im Thermomixer für 5 min bei 95 °C lysiert. Nach 3 min Zentrifugation der Lysate bei 14.000 rpm zur Abtrennung von unlöslichen Bestandteilen wurde 1 µl der geklärten Suspension in einen vorbereiteten 20 µl PCR-Ansatz überführt. Ein exemplarischer PCR-Ansatz zum schnellen Nachweis von Plasmiden in Bakterienkolonien ist in Tabelle 3.3 gezeigt. Für die PCR-basierte Detektion (Screening-PCR) wurden jeweils ein Vektor- und ein Insert-ständiger Primer verwendet. Die Amplifikate wurden nachher durch Gelelektrophorese analysiert. Klone, bei denen eine spezifische erwartete Bande detektiert werden konnte, wurden durch Ausstreichen auf einer LB-Agar-Platte und deren Inkubation bei 37 °C über Nacht expandiert. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA am Folgetag und anschließender Auftrennung im Agarosegel unter Verwendung eines Plasmid-Markers (zirkulärer DNA-Marker) zur Größenabschätzung, wurden die Plasmide mittels Restriktion (3.3.6) und Sequenzierung (3.4.7) überprüft.

Tab. 3. 3: Standardprotokoll Screening-PCR.

Mix:		Cycler-Programm:	
H ₂ O	14,9 µl	94°C	120 s
10 x Platinum Taq Puffer	2 µl	94°C 10 s 55°C 10 s 72°C 60 s/kb	30 x
dNTPs (10 mM)	0,5 µl		
MgCl ₂ (50 mM)	0,5 µl		
sense Primer (10 µM)	1,25 µl		
antisense Primer (10 µM)	1,25 µl		
Platinum® Taq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl		
	Σ 19 µl	4°C	∞
Template DNA	1 µl		

3.4.7 Sequenzierung

Sämtliche Sequenzierungen wurden von der Firma Seqlab, Göttingen durchgeführt. Das Produkt „Extended Hot-Shot“ wurde standardmäßig als Sequenzierungsoption gewählt. Dies ermöglicht die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten mit einer Leseweite von ca. 1200 Basen. Für die Sequenzierung von PCR-Produkten werden 20 pmol Primer und eine definierte Menge Produkt bei einem Gesamtvolumen von 7 µl benötigt: PCR-Produkt-Länge geteilt durch vier ergibt die Menge an

benötigter DNA in Nanogramm. Die Sequenzierungsansätze wurden nach diesem Schema und vorheriger photometrischer Messung pipettiert.

Die Analyse der Sequenzinformationen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Lasergene DNA Star und Bioedit. Die Sequenz wurde dabei auf interpretierbare Chromatogramm-Peaks untersucht und gegebenenfalls getrimmt. Danach erfolgte ein Vergleich mit der jeweiligen Referenzsequenz, um z.B. Mutationen zu identifizieren.

Anschließende Alignments und phylogenetische Analysen wurden mit der Software Mega4 durchgeführt. Die Anordnung von open reading frames (ORF) wurde mit Hilfe des Geneious-Programms untersucht und die Sequenzen auf deren Grundlage auch translatiert. Um Informationen über eine mögliche Faltung der RNA zu erhalten, wurde die Sequenz durch das Programm The mfold Web Server (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/cgi-bin/rna-form1.cgi>) analysiert.

3.4.8 Amplifikation von cDNA

Zur Amplifikation der durch die reverse Transkription generierten cDNA wurde für die Klonierung in den pSMART® Vektor die Expand High Fidelity DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) und für die Subklonierung in den pCR4®-TOPO Vektor die DNA-Polymerase Herculanase® II (Stratagene, Heidelberg) verwendet. In den Tabellen 3.4 und 3.5 sind exemplarisch die Standardprotokolle der verwendeten DNA-Polymerasen dargestellt.

Tab. 3. 4: Standardprotokoll der Expand High Fidelity.

Mix 1:	H ₂ O	18,5 µl	<u>Cycler-Programm:</u>	
	dNTP-Mix 200µM)	1 µl	94 °C	2 min
	Template cDNA	3 µl		
	<i>Sense</i> Primer (10 µM)	1,25 µl	94°C	15 s
	<i>Antisense</i> Primer (10 µM)	1,25 µl	58°C	30 s
			68°C	120 s /kb
			10 x	
Mix 2:	H ₂ O	19,25 µl		
	Expand High Fidelity Puffer	5 µl	4°C	∞
	Expand High Fidelity Enzyme			
	Mix			

Tab. 3. 5: Standardprotokoll der Herculase DNA-Polymerase.

Mix:	H ₂ O	35 µl	Cycler-Programm:	95°C	120 s	
	5 x Herculase-Reaktionspuffer	10 µl				
	dNTPs (25 mM)	0,5 µl	95°C	20 s	30 x	
	<i>sense</i> Primer (10 µM)	1,25 µl	58°C	20 s		
	<i>antisense</i> Primer (10 µM)	1,25 µl	72°C	30 s/kb		
	Herculase II Fusion DNA-Polymerase	1 µl	72°C	180 s		
		<hr/> Σ 49 µl	4°C	∞		
	Template cDNA	1 µl				

3.4.9 Amplifikation von dsDNA

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten von Plasmiden und bei der Extensions-PCR für eine gerichtete Mutagenese wurde die Phusion® Taq DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt/Main) verwendet. Das Enzym zeichnet sich zum einen durch seine besonders hohe Amplifikationsgeschwindigkeit (bis zu 15 s/kb) aus, zum anderen durch die Tatsache, dass das Enzym eine Fehlerkorrekturfunktion (Proofreading) besitzt. Für den Fall, dass nach einem ersten Amplifikationslauf wenig oder eine nur unzureichende Menge PCR-Produkt entstanden war, wurde eine nested- oder seminested-PCR angeschlossen. In diesem zweiten Lauf wurde eine Probe des ersten Laufes als Template eingesetzt. Das eingesetzte flankierende Primerpaar wurde dann, einige wenige Nukleotide eingerückt, komplett neu gewählt (nested-PCR) oder es wurde nur ein Primer neu gewählt und der andere gemäß der ersten Reaktion beibehalten (seminested-PCR). Ein Standardprogramm, das entsprechend der Produktlänge oder an spezielle Bedingungen angepasst wurde, ist in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Tab. 3. 6: Standardprotokoll Phusion Taq DNA-Polymerase.

Mix:	H ₂ O	35,5 µl	Cycler-Programm:	98°C	120 s	
	5 x Phusion® Reaktionspuffer	10 µl				
	dNTPs (25 mM)	1 µl	98°C	20 s	30 x	
	<i>sense</i> Primer (10 µM)	1 µl	58°C	20 s		
	<i>antisense</i> Primer (10 µM)	1 µl	72°C	15 s/kb		
	Phusion® Taq DNA-Polymerase	1 µl	72°C	180 s		
		<hr/> Σ 49 µl	4°C	∞		
	Template cDNA	1 µl				

3.4.10 Touch Down-PCR

Die Touch Down-PCR stellt gegenüber der Standard - PCR eine Abwandlung des Thermocycler-Profiles dar. In einigen der eigentlichen PCR vorgeschalteten Zyklen wird sich der Primer-Annealing-Temperatur von einer hohen Temperatur ausgehend angenähert und nur einige wenige Amplifikate gebildet. Dadurch binden die Primer in den ersten Runden mit höchster Spezifität. Zudem entstehen weniger Nebenprodukte durch Fehlanlagerungen. In der eigentlichen PCR liegen dann wenige neu erzeugte Template-DNAs vor, die amplifiziert werden. Die Touch Down-PCR wurde eingesetzt, wenn bereits im Voraus abgeschätzt werden konnte, dass das zu amplifizierende Template Nukleotidaustausche im Bereich der Primerbindungsstellen aufwies und so die Primerbindung möglicherweise negativ beeinflusst wird.

3.4.11 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)

Bei der Sequenzierung eines viralen Genoms ist es nicht möglich, Primer exakt an den beiden Genomenden zu positionieren und diese Sequenzinformation auch anschließend in der Sequenzierung zu erhalten. Da die Sequenzierung der terminalen Sequenz so ein Problem darstellen würde, bedient man sich einer Methode, die über das Anfügen eines bekannten Sequenzabschnitts die Sequenzierung dieser Nukleotide zulässt.

Das Rapid amplification of cDNA ends (RACE) System ermöglicht die Amplifikation der 5'- und der 3'-Enden. Für die Amplifikation von viralen Genomenden mit natürlichem polyA-Schwanz wird das RACE-Protokoll nur für die Amplifikation des 5'- Endes verwendet. Bei der Primer-Auswahl ist darauf zu achten, dass die cDNA-Synthese von 5' nach 3' verläuft – also am 3'-Ende Nukleotide an die freie OH-Gruppe angehängt werden.

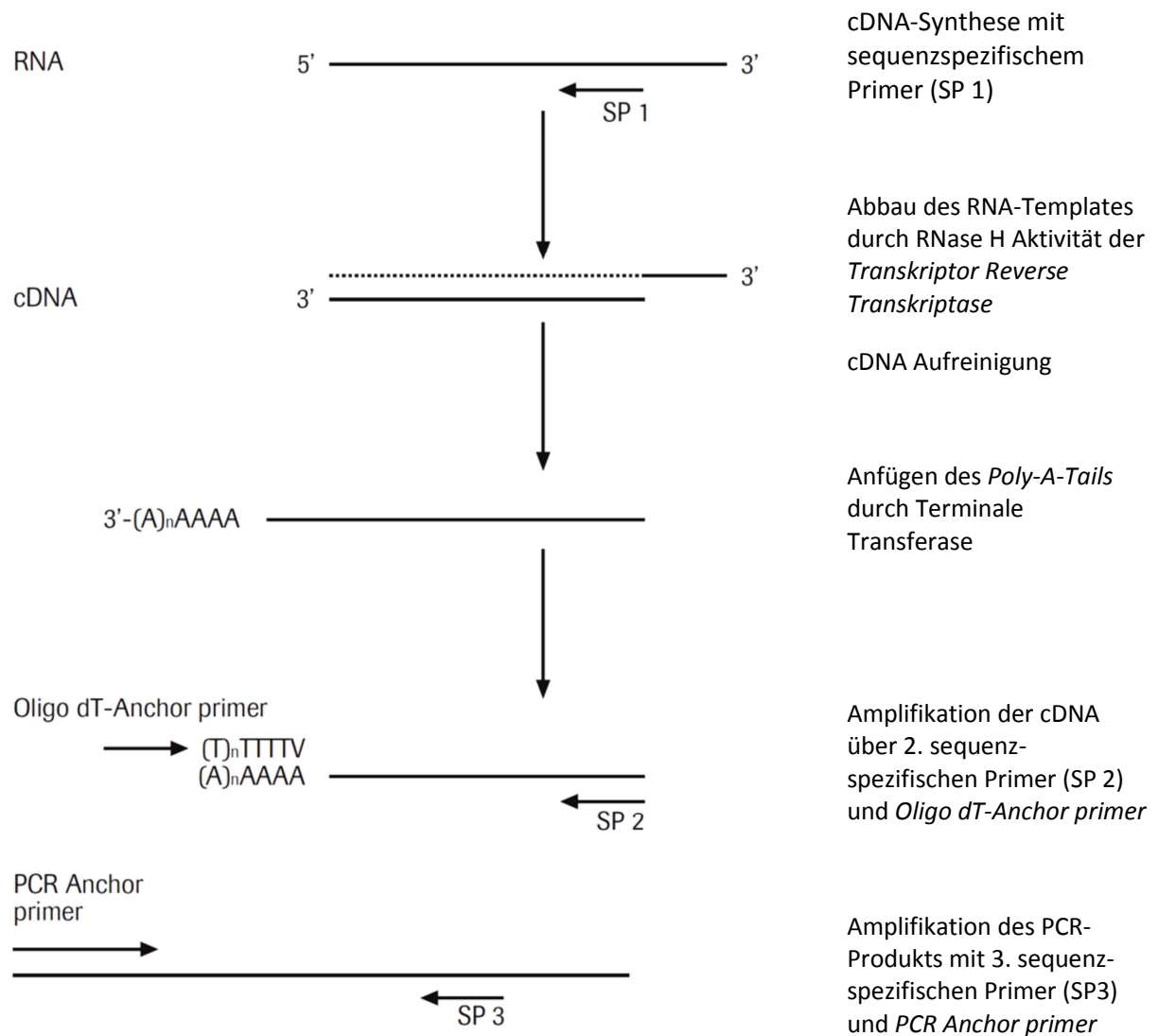


Abb. 3. 6: Exemplarische Darstellung des RACE-Prinzips für die Amplifikation des 5'-Endes eines viralen Genoms (verändert nach Manual: 5'/3' RACE-Kit 2nd Generation, Roche).

Das Prinzip des 5'/3' RACE-Kits 2nd Generation (Roche, Mannheim) ist in Abbildung 3.6 exemplarisch dargestellt. Ein ähnliches Verfahren bietet die Fa. Invitrogen (Karlsruhe) mit dem GeneRacer™ Kit, dessen Verfahrensweise in Abbildung 3.7 A/B gezeigt wird.

Zur Amplifikation des 3'-Endes konnte der polyA-Schwanz des Virusgenoms genutzt werden. Durch Amplifikation über eine semi-nested PCR unter Verwendung eines Oligo-dT als reverser Primer wurde das 3'-Ende des Virusisolats identifiziert.

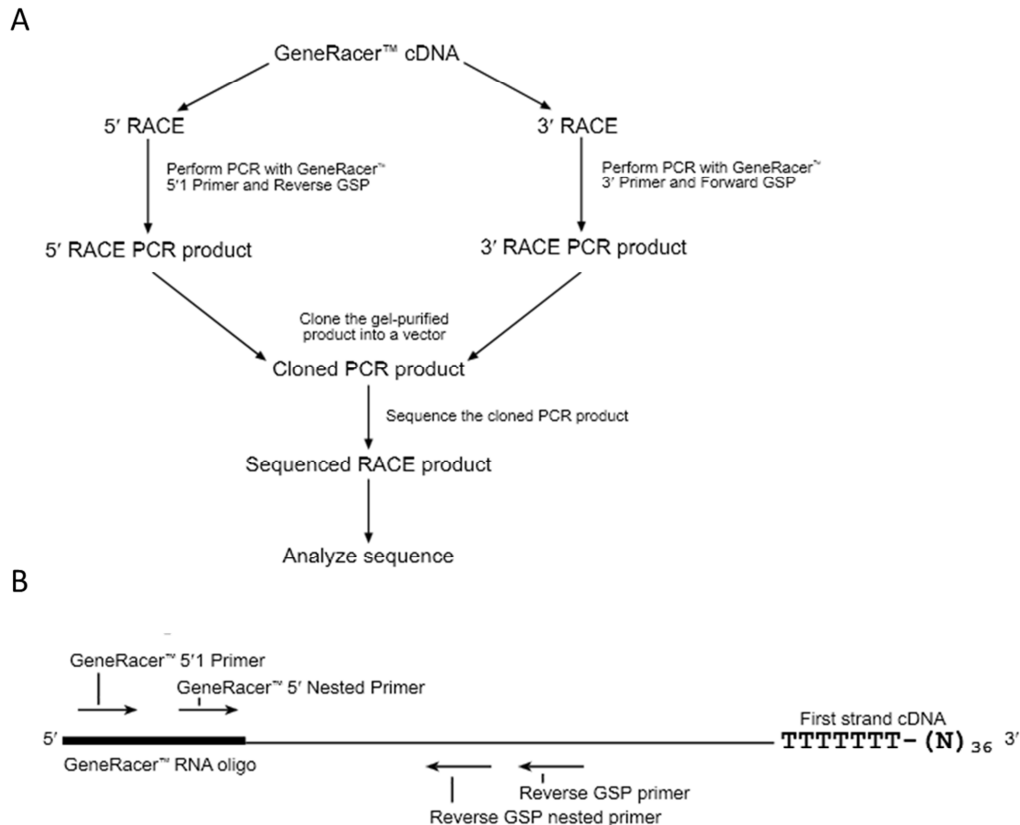


Abb. 3. 7: Exemplarische Darstellung des RACE-Prinzips für die Amplifikation des 5'-Endes eines viralen Genoms (Manual GeneRacer™ Kit; Invitrogen).

(A) Ablaufplan und experimentelle Schritte der Durchführung. (B) Übersicht der Funktionsweise. Das 5'- Genomende wird über einen reversen Gen-spezifischen Primer (GSP) und dem GeneRacer™ 5'1 Primer (im Kit enthalten) amplifiziert. Nur mRNA, die mit dem GeneRacer™ 5'1 Primer am 5'-Ende ligiert und vollständig revers transkribiert wurde, kann amplifiziert werden.

3.4.12 Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR handelt es sich um eine konventionelle PCR, gekoppelt mit der spezifischen Detektion der Amplifikationsprodukte sowie der Möglichkeit der Quantifizierung. Der Nachweis der Produkte erfolgt meistens über eine sequenzspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonde, deren Signal während des PCR-Laufes kontinuierlich gemessen wird. Somit ist eine Verfolgung der Menge an synthetisiertem Amplikon in Echtzeit (Real-Time) möglich, da die Fluoreszenzintensität auch proportional zur DNA-Menge ist [163]. Eine genaue Quantifizierung ist jedoch nur über das parallele Mitführen einer Standardreihe mit DNA oder RNA bekannter Konzentrationen möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde Real-Time PCR zur Detektion des murinen Norovirus aus Zellkulturüberständen verwendet. Das Reaktions- und Cyclerprotokoll ist in Tabelle 3.7 aufgeführt.

Tab. 3. 7: Standardprotokoll Real-Time PCR für Invitrogen *SuperScript™III* one step RT with Platinum® Taq Polymerase Kit.

Mix:			Cycler-Programm:	
H ₂ O	4,5 µl		55°C	20 min
2 x Reaktionspuffer	12,5 µl		95°C	180 s
BSA (1 mg/ml)	0,5 µl		95°C	20 s
Sonde (10 µM)	0,5 µl		58°C	20 s
sense Primer (10 µM)	1,5 µl		72°C	15 s/kb
antisense Primer (10 µM)	1,5 µl			
Enzym Mix	1 µl			
	Σ 22 µl		4°C	∞
Template RNA	3 µl			

3.5 RNA-Techniken

3.5.1 *In-vitro* Transkription

Bei der Transkription wird ausgehend von einer linearisierten Plasmid-DNA eine *in-vitro* RNA synthetisiert. Die zum murinen Norovirus-Genom komplementäre DNA (cDNA) steht im Plasmid unter der Kontrolle eines T7-Promotors (2.2). Daher kann mit Hilfe einer T7-RNA-Polymerase unter Verwendung von Nukleotidtriphosphaten (NTPs) eine RNA synthetisiert werden. Da die MNV-Ribonukleinsäuren ein VPg (virus protein genome-linked) am 5'-Ende aufweisen, wurde ein Cap-Analogon bei der *in-vitro* Transkription eingesetzt. Durch diese Cap-Struktur wird der RNA die spätere Bindung an das Ribosom ermöglicht. Um das authentische 3'-Ende der MNV-RNA zu erhalten, wurde die Plasmid-DNA zunächst mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert, so dass die RNA-Synthese an dieser Stelle abbricht. Nach Restriktion von 1 µg Plasmid-DNA wurden die Restriktionsprodukte durch Phenol-Chloroform gereinigt und anschließend mit Natriumacetat und Ethanol gefällt (3.3.3.2). Die getrocknete DNA wurde in 10 µl Aqua dest. aufgenommen, photometrisch vermessen und in einem 1 %-igen Agarosegel analysiert. 0,5 µg linearisierte DNA wurden anschließend in die *in-vitro* Transkription mit dem mMESAGE mMACHINE® Kit (Ambion, Huntingdon) eingesetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Das Standardprotokoll für die *in-vitro* Transkription ist im Anschluss aufgeführt.

Standardprotokoll der *in-vitro* Transkription:

10 x Reaktionspuffer	2 µl
linearisierte DNA	0,5 µg
NTP/CAP	10 µl
GTP	1-3 µl
T7-RNA-Polymerase Mix	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

3.5.2 DNase-Verdau und Lithiumchlorid-Präzipitation

Die in der *in-vitro* Transkription eingesetzte DNA-Matrize wurde zunächst durch Zugabe von 1 µl Turbo™ DNase (Ambion, Huntingdon) und Inkubation für 15 min bei 37 °C verdaut. Die *in-vitro* RNA wurde durch Zugabe von 30 µl Aqua dest. und 30 µl Lithiumchloridlösung für ≥ 30 min bei -20 °C präzipitiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 16.000 x g und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 400 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen. Das Ribonukleinsäurepellet wurde nach Trocknung bei Raumtemperatur in 20 µl Aqua dest. im Thermomixer bei 37 °C bis zur vollständigen Resuspendierung inkubiert. Mittels Elektrophorese im Agarosegel und photometrischer Messung im UV-Spektrometer wurden die *in-vitro* Transkripte analysiert.

3.5.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Ribonukleinsäuren

Zur Quantifizierung einer RNA-Konzentration wurde die Absorption bei 260 nm gegen H₂O spektralphotometrisch gemessen [160]. Für Ribonukleinsäuren gilt: OD₂₆₀ = 1 entspricht einer Konzentration von 40 µg RNA/ml.

3.5.4 Extraktion viraler RNA

3.5.4.1 Extraktion von Gesamt-RNA aus Zellen

Um Gesamtzell-RNA aus adhärenenten Zellen zu isolieren, wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, in 1 ml Trizol (Invitrogen, Karlsruhe) lysiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Trizol ist eine Einphasenlösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Durch die Zugabe von 200 µl Chloroform und anschließendem Zentrifugieren (15 min, 4 °C, 16.000 x g) trennt sich die Lösung in eine dichtere organische und eine wässrige Phase. Letztere enthält die RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 0,5 ml Isopropanol und anschließender 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Ribonukleinsäure durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 16.000 x g) gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml kaltem, 75 %-igem Ethanol gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation getrocknet. Anschließend wurde die RNA im Thermomixer für 10 min bei 37 °C in 50 µl Aqua dest. resuspendiert.

3.5.4.2 Extraktion viraler RNA aus Zellkulturüberstand

Die virale RNA wurde aus 140 µl Zellkulturüberständen unter Verwendung des QIAamp® Viral RNA Kit (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Die Proben wurden zunächst in 560 µl AVL-Puffer mit carrier-RNA für 10 min bei Raumtemperatur lysiert. Innerhalb dieser Inkubationszeit wurden auch die enthaltenen RNasen inaktiviert, um die Isolation von intakter RNA zu gewährleisten.

Für eine optimale Bindung an die QIAamp-Membran wurde die mit 560 µl Ethanol gepufferte Probe auf die QIAamp-Säule pipettiert. Unerwünscht bindende Substanzen (Proteine, Lipide) wurden in zwei seriellen Waschschritten mit jeweils 500 µl Waschpuffer AW1 und AW2 entfernt. Die RNA wurde mit 60 µl des RNase-freien Puffer AVE eluiert und je nach Verwendung bei -20 °C bzw. -70 °C gelagert.

3.5.5 Reverse Transkription (RT)

Bei der reversen Transkription wird die extrahierte RNA in einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) umgeschrieben. Hierbei finden verschiedene Primer Verwendung, wie z.B. Virus- bzw. Gen-spezifische Primer oder random Hexamere. In Tabelle 3.8 ist das Protokoll für eine Standardreaktion gezeigt.

Tab. 3. 8: Standardprotokoll cDNA Synthese.

Mix 1*:	spezif. Primer (10 µM)	1 µl	Cycler-Programm:	
	dNTPs (10 mM)	1 µl	65 °C	5 min
	RNA Probe	3 µl	auf Eis	1 min
	H ₂ O	7 µl		
		<u>Σ 10 µl</u>		
			<i>-Zugabe Mix 2-</i>	
Mix 2:	First-Strand Buffer (5x)	4 µl	55 °C	50 min
	DTT (0,1 M)	1 µl	70 °C	15 min
	RNase out	1 µl	4 °C	∞
	SuperScript III RT	1 µl		
	H ₂ O	3 µl	-20 °C	Lagerung
	*Mix 1	10 µl		
		<u>Σ 20 µl</u>		

Zur Amplifikation der generierten cDNA wurden die Expand High Fidelity Taq-Polymerase (Roche, Mannheim) und die Herculanase DNA-Polymerase (Stratagene, Heidelberg) verwendet (3.4.8).

3.5.6 Reverse Transkription und PCR im Ein-Schritt-Verfahren (One-step RT-PCR)

Bei dieser Methode wird die reverse Transkription und die PCR in einem Reaktionsansatz durchgeführt. In der ersten Phase wird aus der extrahierten RNA die cDNA synthetisiert, die anschließend als Matrize bei der Amplifikation in der PCR fungiert. Die reverse Transkription wurde in diesem Fall mit der SuperScript® III RT (Invitrogen, Karlsruhe) oder mit einem Mix aus der Sensiscript und Omniscript Reversen Transkriptase (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Als Primer dienten Oligo-dT-Primer, random Hexamere oder Virus-spezifische Primer. Als Basis für die one-step RT-PCR wurde in dieser Arbeit das SuperScript™ III RT with Platinum® Taq Polymerase Kit und das QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit verwendet. Die Amplifikation erfolgte je nach Reaktionsformat im 50 µl oder 25 µl Maßstab. Die verwendeten Standardprotokolle sind in den Tabellen 3.9 und 3.10 dargestellt.

Tab. 3. 9: Standardprotokoll für Invitrogen *SuperScript™III* one step RT with Platinum® Taq Polymerase Kit.

Mix:	2 x Reaktionspuffer	12,5 µl	Cycler-Programm:		
	<i>sense</i> Primer (10 mM)	1,5 µl	55°C	20 min	
	<i>antisense</i> Primer (10 mM)	1,5 µl	95°C	180 s	
	Sonde (10 µM)	0,75 µl	95°C	20 s	45x
	SuperScript™III	1 µl	58°C	20 s	
	RT/Platinum® Taq Mix		72°C	15 s/kb	
	H ₂ O	4,75 µl			
		<u>Σ22 µl</u>			
	Template RNA	3 µl	4°C	∞	

Tab. 3. 10: Standardprotokoll für QIAGEN *OneStep* RT-PCR Kit.

Mix:	5 x Reaktionspuffer	5 µl	Cycler-Programm:		
	dNTP Mix (10 mM)	1 µl	55°C	20 min	
	<i>sense</i> Primer (10 µM)	1 µl	95°C	180 s	
	<i>antisense</i> Primer (10 mM)	1 µl	95°C	20 s	45x
	Sonde (10 µM)	0,5 µl	58°C	20 s	
	Enzym Mix	1 µl	72°C	15 s/kb	
	H ₂ O	12,5 µl			
		<u>Σ22 µl</u>	4°C	∞	
	Template RNA	3 µl			

3.5.7 Herstellung eines Standards zur Quantifizierung von viralen Genomkopien

Der Quantifikationsstandard der MNV Real-Time RT-PCR basiert auf einer *in-vitro* transkribierten RNA. Hierzu wurde die Zielsequenz der RT-PCR in den prokaryotischen Vektor pCR™4-TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Mit den flankierenden, vektorständigen M13- Primern wurde das klonierte Insert einschließlich des Vektor-ständigen T7-Promotors amplifiziert und nach Aufreinigung der Amplifikate über magnetische „beads“ *in-vitro* transkribiert. Die Transkription erfolgte durch das MEGAscript®T7 Kit (Ambion, Huntingdon) nach den Angaben des Herstellers. Einer 2 -ständigen Inkubation bei 37 °C im Brutschrank folgte zum Entfernen der DNA-Matrize ein DNase-Verdau. Nach der anschließenden Präzipitation der Ribonukleinsäure mit Lithiumchlorid und Ethanol und Resuspension des erhaltenen RNA-Pellets in 100 µl RNase-freiem Aqua dest. wurde das Transkript photometrisch quantifiziert (3.5.3).

Standardprotokoll der *in-vitro* Transkription:

10 x Reaktionspuffer	2 µl
ATP solution	2 µl
CTP solution	2 µl
GTP solution	2 µl
UTP solution	2 µl
Template DNA	1 µl
Enzym Mix	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

3.5.8 RNA-Gelelektrophorese

Um Kontaminationen von RNasen zu minimieren, wurde für den Northern Blot ein eigener Satz Apparaturen wie Elektrophoresekammer, Gelschlitten etc. bereitgestellt. Alle verwendeten Lösungen wurden ausschließlich mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt.

RNA muss unter denaturierenden Bedingungen getrennt werden, da der Einzelstrang zur Bildung von Sekundärstrukturen neigt, welche die Laufeigenschaften beeinflussen. Deshalb erfolgt die Elektrophorese in Gegenwart von Formaldehyd, einem denaturierenden Agenz. Es reagiert mit freien Aminogruppen und inhibiert dadurch die Ausbildung von A-U Basenpaaren, wodurch eine mögliche Bildung von Sekundärstrukturen beeinträchtigt wird [164].

In dieser Arbeit wurden 1,5 %-ige MOPS/Formaldehyd-Gele verwendet. Die RNA-Proben wurden 1 : 2 mit dem Ladungspuffer verdünnt und für 10 min bei 65 °C erhitzt. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben zunächst „trocken“ in die Taschen des Gels aufgetragen. Danach wurden die Taschen mit 1x MOPS aufgefüllt und eine Spannung von 70 V für 10 min angelegt. Erst zu diesem Zeitpunkt wurde das vollständige Gel mit 1x MOPS überschichtet. Die Laufzeit betrug 2,5 h bei 80 V. Vor dem Transfer der RNA auf eine Membran wurde das Gel für 2 x 15 min in 20x SSC Puffer gewaschen, um überflüssiges Formaldehyd zu entfernen.

Alle Arbeiten mit Formaldehyd wurden unter einem Abzug durchgeführt, da ein karzinogenes Risiko bestand.

3.5.9 Northern Blot

Als Northern Blot bezeichnet man ein Verfahren, bei der RNA aus einer Gelmatrix auf eine geeignete Trägersubstanz aus Nylon oder Nitrocellulose übertragen wird. Das ursprüngliche Trennmuster der Moleküle bleibt dabei erhalten. Die Fixierung der Moleküle, also die Ausbildung kovalenter Bindungen mit der Membran, erfolgt über ein „Anbacken“ bei 80 °C oder durch Bestrahlung mit UV-Licht. Auf dem Filter fixierte, spezifische RNA-Moleküle können durch Hybridisierung mit radioaktiven oder nicht-radioaktiven Gensonden (Oligonukleotide, Restriktionsfragmente) nachgewiesen werden [165].

In dieser Arbeit wurden Digoxigenin-markierte Gensonden verwendet. Digoxigenin (DIG) ist ein Steroid aus den Blättern des roten Fingerhuts *Digitalis purpurea* und des wolligen Fingerhuts, *Digitalis lanata*. DIG wird bei RNA-Sonden üblicherweise an UTP (Uridintriphosphat) gebunden, da es für RNA spezifisch ist [166]. Die Detektion erfolgt über einen anti-DIG-Antikörper, der mit einem Reporterenzym (Alkalische Phosphatase) gekoppelt ist. Zudem wird Digoxigenin nur im gebundenen Zustand erkannt.

Der Blot wurde in Form eines „Sandwichs“ in 20x SSC Transfer-Puffer aufgebaut (von unten nach oben): 2 Lagen 3MM Whatman Papiere, das RNA-Gel und die positiv geladene Nylon-Membran (Roche, Mannheim). Alle Bestandteile wurden zuvor in 20x SSC getränkt. Den Abschluß bildeten 2 Lagen trockenes 3MM Whatman Papier sowie ein 5 cm hoher Stapel trockener Papiertücher. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte für mind. 6 h oder über Nacht. Danach wurde die Membran in 2x SSC Puffer gewaschen. Die RNA wurde bei 120 °C für 30 min durch „Backen“ auf der Membran fixiert.

Die Prä-Hybridisierung der Membran mit DIG Easy Hyb Lösung (Roche, Mannheim) erfolgte bei 50 °C für 30 min, rotierend im Hybridisierungssofen. Erst danach fand die „eigentliche“ Hybridisierung der Membran mit einer DIG-markierten Sonde statt. Dazu wurde die gewünschte Menge Sonde (2µl/ml) mit DIG Easy Hyb Lösung versetzt und für 6-16 h bei 50 °C rotierend hybridisiert.

Die Detektion erfolgte mittels DIG Wash and Block Buffer Set (Roche, Mannheim). Dazu wurde die Membran in verschiedenen Waschschritten gereinigt, blockiert und mit der Antikörper-Lösung versetzt. Der Anti-DIG-AP wurde 1:10.000 eingesetzt und für 30 min mit der Membran bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrritte. Danach wurde die Membran mit 10-15 Tropfen des Chemilumineszenz-Substrats CDP-Star (Roche, Mannheim) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 5-10 min in einer luftblasenfreien Plastikfolie. Je nach Stärke der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm (Kodak, BioMax XAR Film) für 1 - 600 s aufgelegt. Nach der Entwicklung des Films konnten mit Hilfe des DIG-markierten RNA Molecular Weight Markers I (Roche, Mannheim) die RNA-Größen bestimmt werden.

3.5.9.1 Herstellung DIG-markierter Gensonden

Die Generierung der Gensonden für den Northern Blot erfolgte mittels PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim). Dazu wurde der gewünschte Bereich des Virusgenoms mit spezifischen Primern in einer PCR amplifiziert. Das Standardprotokoll ist in Tabelle 3.11 dargestellt.

Tab. 3. 11: Protokoll der DIG-Markierung der Sonden.

		neg. Ktr.	DIG-Sonde	Cycler-Programm:	
Mix:	10x PCR buffer with MgCl ₂ (vial 3)	5 µl	5 µl	95°C	180 s
	PCR DIG Probe Synthesis Mix (vial 2)	-	5 µl	95°C	30 s
	dNTP stock (vial 4)	5 µl	-	58°C	30 s
	Forward Primer (10µM)	5 µl	5 µl	72°C	60 s
	Reverse Primer (10µM)	5 µl	5 µl	72°C	420s
	enzyme mix (vial 1)	0,75 µl	0,75 µl	4°C	∞
	H ₂ O	28,25 µl	28,25 µl		
	Template cDNA	1 µl	1µl		
	Total	50 µl	50 µl		

3.6. Proteinanalyse

3.6.1 Gießen von Polyacrylamidgelen

Zuerst wurden die Komponenten für das Trenngel vermischt. Davon wurden jeweils 8 ml pro Gel in die Gelkassette gegossen. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3.12 dargestellt. Mit Aqua bidest. wurde das Trenngel überschichtet und für ca. 30 min polymerisiert. Danach wurde das Aqua bidest. entfernt und die Komponenten für das Sammelgel angesetzt. Das Sammelgel wurde vorsichtig auf das Trenngel gegeben und der Taschenkamm konnte eingeschoben werden. Das Gel polymerisierte für weitere 30 min. Die Lagerung der Polyacrylamidgele erfolgte für maximal eine Woche bei 4 °C.

Tab. 3. 12: Gießen der Gele: Pipettierschema für 2 Polyacrylamidgele (1,5 x 60 x 80 mm).

	Trenngel 15 %	Trenngel 12 %	Trenngel 10 %	Trenngel 6,5 %	Sammelgel
Acrylamid	6,75 ml	5,4 ml	4,5 ml	2,9 ml	750 µl
Trenngelpuffer	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml	4,5 ml	
Sammelgelpuffer					1,7 ml
Wasser	6,75 ml	8,1 ml	9,0 ml	10,6 ml	4,24 ml
APS 10 %	60 µl	60 µl	60 µl	60 µl	20 µl
Temed	13,5 µl	13,5 µl	13,5 µl	13,5 µl	12 µl

3.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS maskiert die Eigenladungen der Proteine und verändert deren native Konformation. Daher werden in Gelen aus vernetztem Polyacrylamid, Proteine in einem elektrischen Feld proportional zu ihrer molekularen Masse und unabhängig ihrer Ladung aufgetrennt [167, 168]. Die Elektrophorese erfolgte mit Hilfe des NuPage Elektrophoresesystems (Invitrogen, Karlsruhe) mit 4-12 %-igen BisTris-Gradientengelen oder selbstgegossenen Polyacrylamidgelen (3.6.1). Nach Einsetzen des Gels in die Elektrophoresekammer wurde diese mit Laemmli-Laufpuffer gefüllt und die Geltaschen mit den vorbereiteten Proben beladen. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 2x SDS und 0,1 M DTT versetzt, für 10 min bei 95 °C im Thermomixer inkubiert und bei 14.000 rpm zentrifugiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann bei 120 V. Durch das Auftragen eines gefärbten Proteinmarkers konnte die Auftrennung verfolgt und die Elektrophorese entsprechend der erwarteten Proteingröße gestoppt werden. Um die Proteingröße im Western Blot später bestimmen zu können, wurde der Proteinmarker MagicMark™ XP Western Protein Standard (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Die direkte Analyse der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Coomassie-Färbung (3.6.3.1).

3.6.3 Detektionsmethoden der Proteinanalyse

3.6.3.1 Coomassie-Färbung

Bei der Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau lagert sich dieser Triphenylmethanfarbstoff an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit Proteine unspezifisch. Zur Anfärbung von SDS-PAGES wurde der SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Zur Eliminierung von störenden Reagenzien, wie SDS und Harnstoff, wurden die Polyacrylamidgele zunächst dreimal in Aqua dest. gewaschen und für etwa 5 min auf einem Schüttler geschwenkt. Nach erfolgter Färbung der Gele mit dem Coomassie-Farbstoff wurden unspezifische Färbungen durch Zugabe von NaCl entfernt. Die so gefärbten Gele wurden auf einem Flachbettscanner eingescannt.

3.6.3.2 Western Blot

Beim Western Blot werden in einer SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamid-Matrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen. Bei diesem Vorgang bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten, das an den Proteinen angelagerte SDS dissoziiert. Daher können die Proteine teilweise renaturieren und von primären Antikörpern erkannt werden. Der sekundäre Antikörper ist mit einer Peroxidase (horseradish peroxidase - HRP) konjugiert, die verschiedene Substrate umsetzen kann. Durch die Oxidation des Substrates entsteht ein chemilumineszierendes Präzipitat, das über eine Filmbelichtung detektiert werden kann.

Nach der Auftrennung der Proteine wurden die SDS-Polyacrylamidgele auf eine Nitrocellulose-Membran gelegt. Von beiden Seiten mit Filterpapier umgeben, wurde das Gel zur Kathode, die Membran zur Anode gerichtet, in die Blotting-Apparatur eingespannt. Der Proteintransfer erfolgte 2 h lang unter einer angelegten Spannung von 30 V im Transferpuffer. Um die freien Bindungsstellen auf der Western Blot-Membran zu blockieren, wurde letztere über Nacht in 1:10 verdünntem Roti® Block (Roth, Karlsruhe) inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1x PBS mit 0,05 % Tween (PBS-T) gewaschen. Danach erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper in 1x PBS mit 0,05 % Tween (2.7.5.5). Nach erneutem Waschen der Membran wurde diese mit dem sekundären, HRP-konjugierten Antikörper inkubiert (2.7.5.6). Abschließend wurde die Membran nach zweimaligem Waschen mit PBS-T mit der Chemilumineszenz-Substratlösung für 5 min versetzt (2.7.5.7). Die Nitrocellulose-Membran wurde in eine Plastikfolie eingeschlagen. Je nach Stärke der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm (Kodak, BioMax XAR Film) für 1- 600 s aufgelegt. Nach der Entwicklung des Films konnten mit Hilfe eines gefärbten Proteinmarkers die Proteingrößen bestimmt werden.

4. ERGEBNISSE

4.1 Das zytopathogene murine Norovirus- (MNV) Isolat

Das in dieser Arbeit verwendete Virusisolat wurde von der Fa. Newlab/Charles River aus Köln erhalten. Dabei handelt es sich um einen zytopathogenen Stamm, der in RAW264.7 Zellen repliziert. Das murine Norovirus Isolat befand sich im Zellkulturüberstand. Es waren keine zusätzlichen Genom- bzw. Sequenzinformationen des Stammes vorhanden.

4.1.1 Genomanalyse

Zur Analyse des MNV-Genoms wurde zunächst ein Alignment aller in der NCBI Datenbank (GenBank: BLASTn) zur Verfügung stehenden murinen Norovirus-Vollgenome mittels DNA Lasergene SeqMan und MEGA 5.0 durchgeführt (Abbildung 4.1).



Abb. 4. 1: Alignment aller in der Genbank zur Verfügung stehenden MNV-Vollgenome mittels MEGA 5.0.

Basierend auf den konservierten Genomabschnitten wurden Primer im Bereich des 5'/3'-Genomendes sowie der Genommitte entworfen, um das Virusisolat partiell zu sequenzieren.

Nach der Extraktion der viralen RNA aus Zellkulturüberstand (3.5.4.2) wurde zunächst cDNA generiert (3.4.8), die als Template für touchdown hemi-nested PCRs diente (3.4.10). Die amplifizierten Produkte wurden danach durch Gelelektrophorese analysiert und entsprechend aufgereinigt. Die sauberen PCR-Produkte wurden schließlich zur Sequenzanalyse an die Firma SeqLab übergeben (Abbildung 4.2).

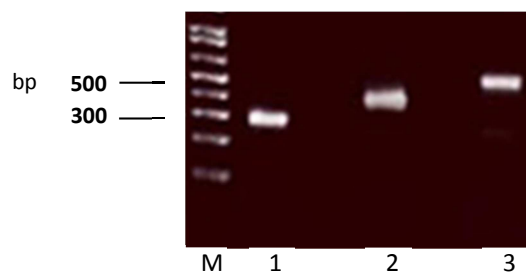


Abb. 4. 2: Elektrophoretische Auftrennung der ersten drei Subfragmente des MNV-Genoms im Agarosegel. Fragmente (1: F7197-OligodT; 2: F3820-R3991; 3: F37-R661). M: DNA-Molekulargewichtsmarker I, 100bp-Intervalle.

Konnte eines der Subfragmente fehlerfrei sequenziert werden, wurde dieser Genombereich direkt für ein neues Primerdesign genutzt, um den nächsten angrenzenden Genomabschnitt zu untersuchen. Durch diese Methode wurde ein MNV-Teilstück nach dem anderen sequenziert und mittels DNA Lasergene SeqMan analysiert. Insgesamt wurden sieben überlappende Subfragmente generiert und mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing (Invitrogen, Karlsruhe) in den pCR™4-TOPO® Vektor kloniert (3.4.1). Abbildung 4.3 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der für die Sequenzierung erzeugten partiellen Amplifikate.

Zusätzlich wurde versucht, die nicht translatierte Region des 5'-Endes (5'-NTR) über das 5'/3' RACE Kit 2nd Generation (Roche, Mannheim; 3.4.11) zu amplifizieren und sequenzieren. Da es an dieser Stelle jedoch zu Komplikationen kam, wird die Charakterisierung des 5'-Terminus im nächsten Abschnitt detaillierter beschrieben. Die 3'-NTR konnte über einen OligodT-Primer im 3'RACE-Verfahren vervielfältigt werden, da Noroviren einen polyA-Schwanz besitzen.

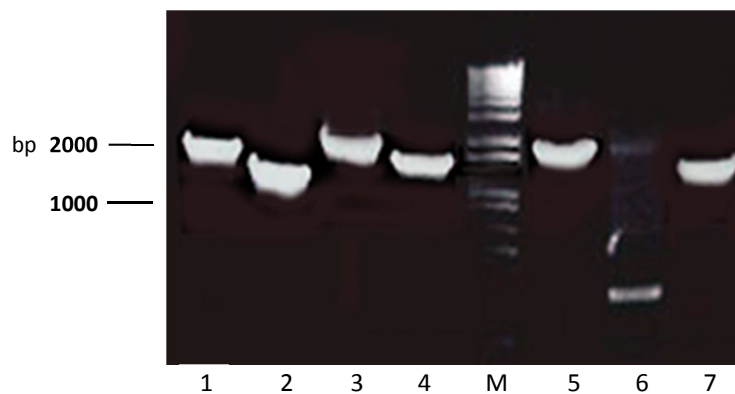


Abb. 4. 3: Gelelektrophoretische Auftrennung der partiellen MNV-Amplifikate vor der Klonierung in den pCR™4-TOPO® Vektor (Invitrogen, Karlsruhe). Auftrennung der zur Sequenzanalyse generierten Subfragmente. Fragmente (1: F740-R1446; 2: F1066-R2552; 3: F2302-R3473; 4: F3264-R5117; 5: F4780-R6278; 6: F740-R2552 7: F5599-OligodT). M: DNA-Molekulargewichtsmarker I.

Das abschließende Alignment aller erzeugten MNV-Subfragmente mittels DNA Lasergene SeqMan, ergab schließlich die vollständige Genomsequenz. Durch die NCBI Datenbank (GenBank: BLASTn) wurde ermittelt, dass es sich bei dem untersuchten Virusisolat zu 98 % um den Stamm Berlin 06/06/DE (Genbank Nr.: EF531291) handelt. Sieben Mutationen wurden insgesamt festgestellt, fünf davon erzeugen keinen Aminosäureaustausch (Tabelle 4.1).

Tab. 4. 1: Mutationen des untersuchten MNV-Isolats im Vergleich zu Stamm Berlin 06/06/DE.

Position	Mutation	Austausch
711	A → G	Ile → Val
2036	G → C	Silent
2183	G → C	Silent
2234	G → C	Silent
5146	C → T	Pro → Ser
5957	C → T	Thr → Ile
6149	T → C	Val → Ala

4.1.2 Charakterisierung des 5'-Terminus

Um die vollständige Genomsequenz des MNV-Isolats zu erhalten, war das primäre Ziel den noch fehlenden 5'- Genombeginn zu sequenzieren. Ein nicht korrekter 5'- Terminus könnte in den weiteren Arbeiten zu einem Translationsblock durch schlechtes Capping führen. Zudem kann das VPg nur mit einem passenden 5'- Genombeginn interagieren.

Zu Beginn der MNV-Genomanalyse wurde das 5'/3' Race Kit, 2nd Generation (Roche, Mannheim) angewendet (3.4.11). Dies führte trotz verschiedener Optimierungsversuche des Protokolls zu keinen Amplifikaten. Deshalb wurde eine unkonventionelle Methode angewandt.

Tab. 4. 2: Übersicht der Nukleotidabfolge zwischen 5'-Genomanfang und dem subgenomischen Promotor verschiedener MNV-Isolate. Die Position des Basenaustausches ist unterstrichen dargestellt.

Isolat	5'- Genomanfang	Subgenomischer Promotor	Genomgröße (bp)
Berlin06/06/DE	GTGAAAT	GT <u>A</u> AAT	7383
MNV – 1	GTGAAAT	GT <u>G</u> AAT	7383
MNV – 3	GTGAAAT	GT <u>G</u> AAT	7383
Berlin04/06/DE	GTGAAAT	GT <u>G</u> AAT	7390
Berlin05/06/DE	GTGAAAT	GT <u>G</u> AAT	7383

Der Genomanfang von Caliciviren ist in vielen Fällen der subgenomischen Promotorsequenz sehr ähnlich. Deshalb wurde ein 13mer Primer mit genau dieser Sequenz synthetisiert. Als eine weitere Möglichkeit der Nukleotidabfolge des MNV 5'-Terminus diente die Sequenz des nahverwandten Stammes Berlin 06/06/DE. Dieser 12mer Primer wurde ebenfalls synthetisiert. In Tabelle 4.2 ist ein Vergleich der unterschiedlichen 5'-Termini mit den jeweiligen subgenomischen Promotor-Anfängen dargestellt. Die MNV-Isolate unterschieden sich an den aufgeführten Positionen in nur einem Nukleotid. Der verwandte Stamm Berlin 06/06/DE zeigte einen Basenaustausch von Guanin zu Adenin.

Für die Analyse des 5'- Genomanfangs wurde zunächst cDNA mit dem reversen Primer R474 produziert (3.4.8). Mit den beiden *sense* Primern 5'Berlin_fwd und sgPromotor_fwd wurde für einen direkten Vergleich eine Gradienten-PCR mit drei verschiedenen Annealing-Temperaturen durchgeführt. Abbildung 4.4 zeigt das Ergebnis mit einem eindeutigen Bandenverlauf auf Seiten des eingesetzten 12mer Primers, welcher den Genombeginn von Stamm Berlin 06/06/DE trägt. Das Amplifikat besitzt die Größe von 474 bp und wurde bei allen drei verwendeten Annealing-Temperaturen produziert. Der 13mer Primer, welcher die subgenomische Promotorsequenz trägt, zeigte bei keiner Annealing-Temperatur ein Amplifikat. Der 5'-Terminus des untersuchten Isolats ist demnach mit dem von Stamm Berlin 06/06/DE und nicht mit dem subgenomischen Promotor identisch.

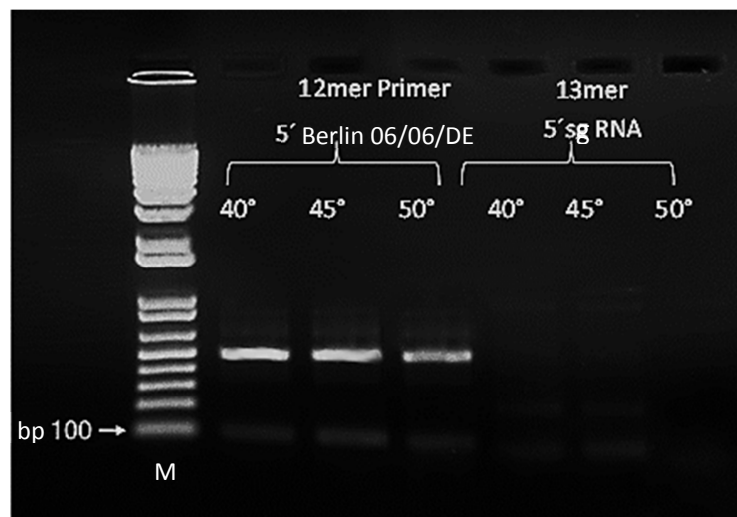


Abb. 4. 4: Gelelektrophoretische Auftrennung der 5'-Genom Analyse des MNV.

Durch den 12mer Primer mit dem 5'- Genomende von Stamm Berlin 06/06/DE wurden drei Banden bei drei verschiedenen Annealing-Temperaturen produziert. Der 13mer Primer mit der Nukleotidabfolge des subgenomischen Promotors zeigte unter diesen Bedingungen keinerlei Amplifikate. M: DNA-Molekulargewichtsmarker I, 100bp-Intervalle.

Aufgrund des Resultats wurde in den nachfolgenden Arbeiten der infektiöse MNV cDNA-Klon mit dem 5'-Terminus des Berliner Stammes 06/06/DE konstruiert.

In unserer Arbeitsgruppe werden für die Charakterisierung des 5'-Terminus standardmäßig zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Das Generacer™ Kit (Invitrogen, Karlsruhe) und das 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation (Roche, Mannheim). Beide Verfahren wurden in Kapitel 3.4.11 beschrieben und führten bis dahin zu keinen Amplifikaten des 5'-Terminus. Die Arbeitsweise des Generacer™ Kits wurde deshalb optimiert. Als entscheidend stellte sich dabei die Vorbehandlung der viralen RNA

heraus. Vor der cDNA-Synthese wurde die frisch extrahierte MNV-RNA für 3 min bei 98 °C erhitzt. Danach erfolgte ein rasches Abkühlen für 10 min in Eiswasser. Dieser zusätzliche Arbeitsschritt führte zur Denaturierung der viralen RNA mit dem Ziel, die vorhandenen Sekundärstrukturen zu zerstören. Die cDNA-Synthese wurde mit dem reversen Primer R490 durchgeführt. Durch zusätzliche („nested“) Amplifikation mit dem reversen Primer R273 wurde schließlich ein sauberes Amplifikat produziert (Abbildung 4.5). Dieses wurde nach einer Agarosegelaufreinigung sequenziert und lieferte den tatsächlichen Genombeginn des MNV. Der zuvor anhand von Amplifikationsexperimenten ermittelte wahrscheinliche 5'- Genombeginn des MNV Stamm Berlin 06/06/DE wurde bestätigt.

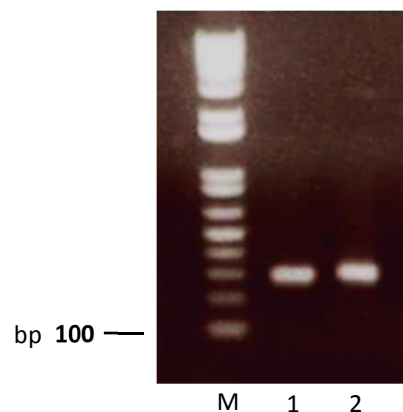


Abb. 4. 5: Doppelansatz 5' – RACE – PCR mit nested Primer R273 sowie dem im Kit enthaltenen Primer UAP.

Produkt 1 zeigt die Amplifikation mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. Produkt 2 wurde mit der Platinum® Taq DNA Polymerase generiert. M: DNA-Molekulargewichtsmarker I, 100bp-Intervalle.

4.1.3 Quantifizierung des MNV: Etablierung einer spezifischen Real-Time RT-PCR

Durch eine quantitative Real-Time RT-PCR wurde die Detektion viraler RNA im Zellkulturüberstand ermöglicht. Die Zielsequenz dieser PCR liegt im Bereich von ORF3, dem kleinen Strukturprotein VP2 des murinen Norovirus. Das Primerdesign erfolgte mit dem Online Programm Genscript. Die Reaktionsbedingungen sowie die verwendeten Oligonukleotide sind unter 3.5.6 und 2.3.8 dargestellt. Die Sensitivität der Real-Time PCR wurde über zwei unabhängige, serielle Verdünnungsreihen eines zuvor photometrisch quantifizierten *in-vitro* Transkripts, das die Zielsequenz der PCR enthielt, getestet und mit Hilfe einer Regressionsanalyse ausgewertet (Abbildung 4.6).

Das Transkript wurde via TOPO® TA Klonierung der Zielsequenz in den pCR™4-TOPO® Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) und durch die Transformation von chemisch kompetenten One Shot® Top10 *E.Coli* (Invitrogen, Karlsruhe), generiert. In Abbildung 4.6A ist das Ergebnis einer PCR mit vektorständigen M13-Primern eines zuvor auf die Zielsequenz positiv getesteten Plasmids dargestellt. Das Plasmid wurde vor der PCR seriell verdünnt. Als DNA-Template für die *in-vitro*

Transkription mittels MEGAscript® T7 Kit (Invitrogen, Karlsruhe) wurde aus dieser PCR diejenige Plasmidverdünnung ausgewählt, die gerade noch eine gut erkennbare Bande zeigt. In diesem Fall wurde das Plasmid 1:1000 verdünnt.

Die Detektionsgrenze der generellen MNV Real-Time RT-PCR lag bei 4045 RNA-Kopien pro ml Zellkulturüberstand.

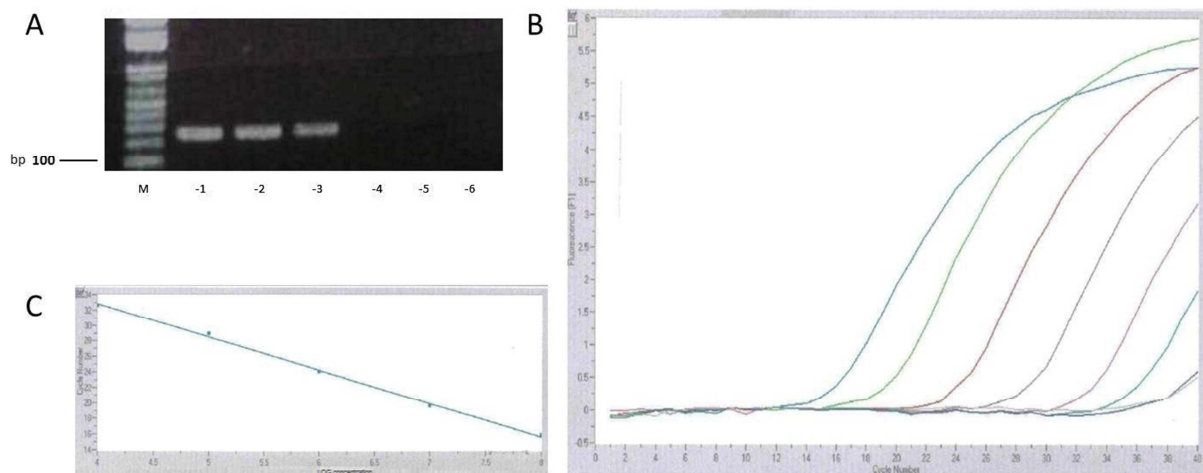


Abb. 4. 6: Herstellung eines *in-vitro* Transkripts als Standard für Real-Time RT-PCR.

(A) Verdünnungsreihe des Plasmids mit der Zielsequenz vor der *in-vitro* Transkription. Die letzte noch sichtbare Bande war bei einer Verdünnungsstufe von -3 zu sehen. Das Plasmid wurde 1:1000 verdünnt. M: DNA-Molekulargewichtsmarker I, 100bp-Intervalle. (B) Real-Time RT-PCR mit zehnfach verdünntem Transkript, insgesamt bildeten sieben Verdünnungsstufen eine Standardreihe. (C) Linearität und Effizienz der Real-Time RT-PCR wurden durch lineare Regression berechnet und zeigten eine gute negative Linearität ($r = -1,00$; Error = 0,127; Steigung = -4,284, Schnittpunkt = 49,95). Daraus ergab sich eine Geradengleichung von $y = -4,284x + 49,95$. Die grünen Punkte repräsentieren die CPs (Crossing Points) der jeweiligen Verdünnungen.

4.1.4 Darstellung des zytopathischen Effektes des MNV

Charakteristisch für dieses MNV-Isolat ist die Fähigkeit, Gewebekulturzellen zu lysieren. Als Folge einer starken Lyse der Zellen werden Löcher im Zellrasen sichtbar, die mittels Kristallviolett-Färbung dargestellt werden können.

Um den zytopathischen Effekt (ZPE) zu untersuchen, wurde die stark permissive murine Makrophagen Zelllinie RAW264.7 mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 0,1 infiziert und die Entwicklung des ZPE beobachtet. Nach 48 h konnte im Lichtmikroskop eine diffuse Verteilung von zerstörten bzw. abgekugelten Zellen im Zellrasen beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Infektion traten kleine Löcher im Zellrasen auf, die mittels Kristallviolett-Färbung in einem Plaque-Assay dargestellt werden konnten (3.1.6).

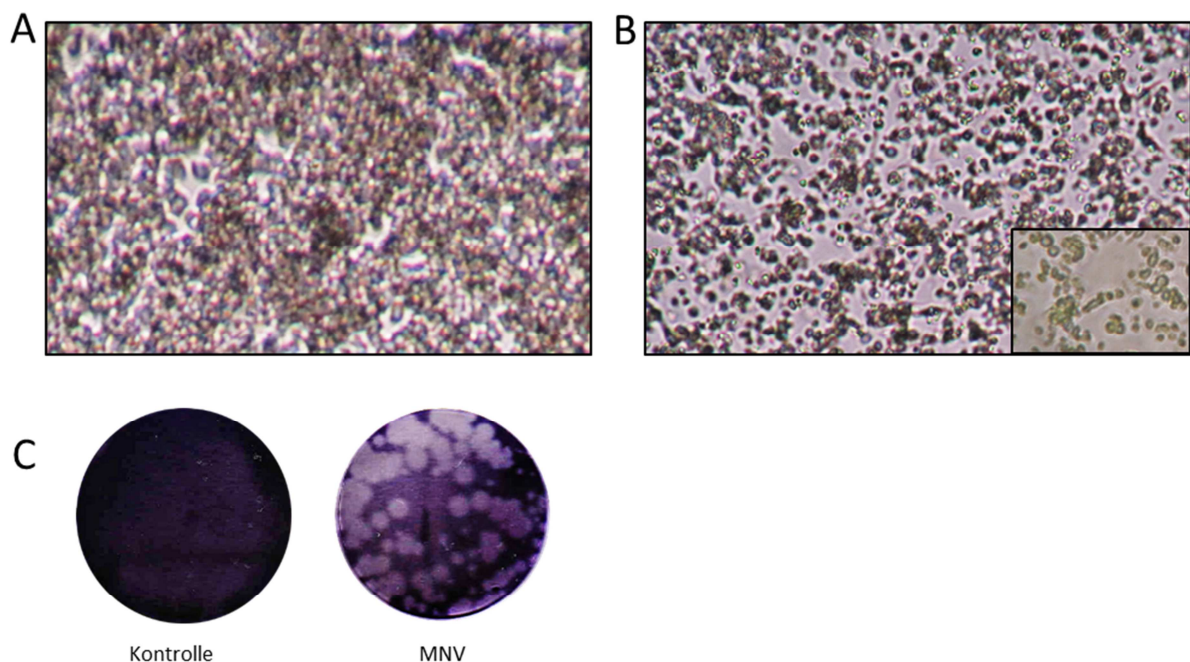


Abb. 4. 7: Darstellung des zytopathischen Effektes des MNV.

Analyse des zytopathischen Effektes durch das Lichtmikroskop. RAW264.7 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit dem MNV Isolat infiziert. Die lichtmikroskopische Aufnahme wurde 48 h nach der Infektion durchgeführt. (A) zeigt den Zellrasen der Mock-Kontrolle und (B) infizierte RAW264.7 Zellen. (C) Analyse des zytopathischen Effektes mittels Kristallviolett-Färbung. RAW264.7 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit dem MNV Isolat infiziert und nach einer Stunde mit Avicel-Overlay versehen. Die Färbung des Zellrasens mit Kristallviolett erfolgte 48 h nach der Infektion. Abgebildet ist ein Kontroll-Zellrasen sowie ein mit MNV infizierter Well.

4.2 Herstellung eines rekombinanten murinen Norovirus

4.2.1 Das reverse Genetiksysteem des MNV

Ziel war die Entwicklung eines leicht zu handhabenden und robusten reversen Genetiksystems für das murine Norovirus. Das MNV-Genom sollte dabei direkt im Zytoplasma in Form von RNA bereitgestellt werden und nicht als full-length cDNA transfiziert, im Zellkern in infektiöse RNA transkribiert werden. Es wurde ein Verfahren gewählt, was ein T7 RNA-Polymerase Promotor-System für die *in-vitro* Transkription von gecappter, infektiöser RNA nutzt. Ein weiterer wichtiger Punkt für dessen Umsetzung war die DNA-Präparation so leicht und effizient wie möglich durchzuführen. Deshalb wurde das low-copy Vektorsystem von pSMART (Lucigen, Middleton) verwendet, da dieses eine sehr gute Plasmidstabilität bei gleichzeitig hoher Ausbeute an DNA liefert.

Beim Aufbau des infektiösen Klon wurde das MNV-Genom in sechs subgenomische Bereiche unterteilt und durch die Primer (Tabelle 2.1 / 2.2) als PCR-Fragmente amplifiziert. Diese Fragmente wurden in den pSMART LCKan-Vektor kloniert. Die resultierenden Subklone wurden anschließend auf Mutationen geprüft. Vereinzelt aufgetretene Punktmutationen der Subklone und eine Marker-mutation wurden erfolgreich durch Fragment-Fusions PCR korrigiert und eingeführt. Um den vollständigen full-length cDNA-Klon zu erhalten, erfolgte der Zusammenbau der korrekten Subklone in einem sukzessiven Prozess (Abbildung 4.8). Der Gesamtklon wurde erneut sequenziert, um die Markermutation und die Abwesenheit weiterer Mutationen zu bestätigen. Ein Verdau des Gesamtklons mit dem genetischen Marker *RsrII* spaltete das Genom in die entsprechenden Fragmente.

Der MNV full-length Klon besaß zusätzlich am 3'- Genomende eine einmalige *NotI*-Restriktions-schnittstelle nach einem 24-Nukleotid langen polyA-Schwanz. Am 5'- Genomende befand sich der T7 RNA-Polymerase-Promotor für die *in-vitro* Transkription. Die daraus entstandenen gecappten RNA-Transkripte enthielten keine Sequenz nicht-viralen Ursprungs. Das rekombinante Virus wurde als rMNV bezeichnet.

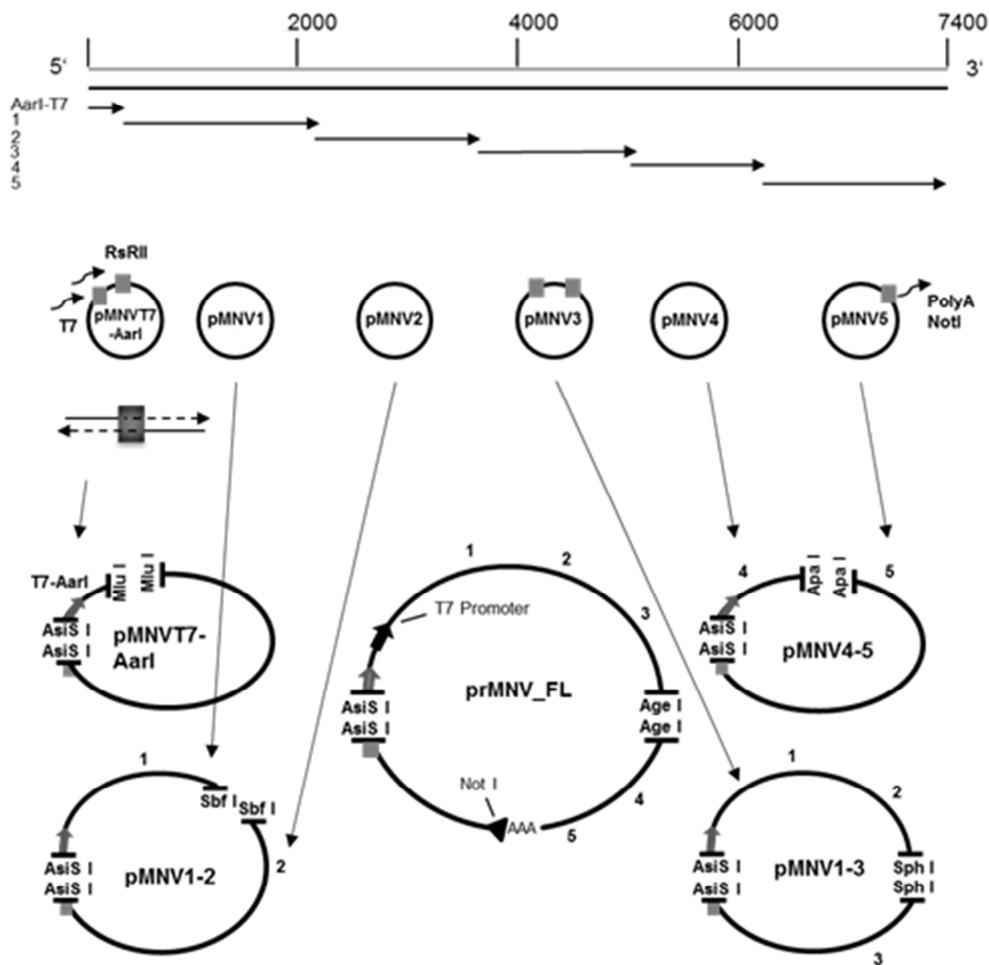


Abb. 4. 8: Zusammenbau des MNV full-length cDNA-Klons.

Nach dem Klonieren der fünf Subfragmente in das low-copy pSMART LCKan Vektorsystem, folgte ein sukzessiver Zusammenbau des MNV full-length Klons. Fragment 1 (pMNV-1) und 2 (pMNV-2) wurden aus dem Vektor durch *SbfI* und *AsiS I* geschnitten. Danach wurden die beiden Fragmente miteinander ligiert und bildeten den neuen Subklon pMNV1-2. Im nächsten Schritt wurde Fragment 3 aus pMNV-3 durch *SphI* und *AsiS I* geschnitten. Auch pMNV1-2 wurde mit diesen beiden Enzymen verdaut, so dass Fragment 3 daran ligiert werden konnte. Der neu entstandene Subklon wurde als pMNV1-2-3 bezeichnet. Als Nächstes wurde der Strukturproteinanteil des MNV-Genoms durch einen Subklon miteinander verbunden. Dazu wurde pMNV-4 mit pMNV-5 durch die gemeinsame *ApaI* Schnittstelle und *AsiS I*, als vektorständiger Schnittstelle, ligiert. Das Plasmid wurde pMNV4-5 genannt. Danach wurden die Strukturproteine (ORF 2 und ORF 3) mit den Nichtstrukturproteinen (ORF 1) verbunden, um den full-length cDNA-Klon zu erhalten. Dieser Schritt erfolgte über die gemeinsame *AgeI* Schnittstelle und den Verdau von *AsiS I*. Als letztes wurde der T7-Promotor mit der zusätzlichen *AarI* -Schnittstelle, das 5'-Genomende und der genetische Marker *RsrII* über das Enzym *MluI* mit dem Gesamtklon verbunden.

Nach der Herstellung von cDNA mittels Reverser Transkriptase SuperScriptIII (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte die Amplifikation der Subfragmente mit der Platinum® Taq DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe). Es wurden 5'-phosphorylierte Primer für eine blunt-end Klonierung konzipiert, da das pSMART Vektorsystem für derartige Klonierungsprozesse gut geeignet ist. Die amplifizierten Fragmente (Abbildung 4.9C) wurden im präparativen Agarosegel aufgetrennt und über das QIAEX® II Gel Purification Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert (3.3.3.4). Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden danach in den pSMART LCKan Vektor ligiert (3.4.3). Chemisch kompetente One Shot® Stbl3™ *E. coli*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert. Jeweils acht Einzelklone pro Ligationsprodukt wurden auf eine LB-Agar-Platte mit Kanamycin ausgestrichen. Nach einer Inkubation von 16 h bei 37 °C im Brutschrank wurden die erhaltenen Plasmide mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die Größenanalyse der präparierten Plasmide erfolgte im Agarosegel mit Hilfe des supercoiled DNA Markers (Invitrogen, Karlsruhe). Über ein gerichtetes Screening unter Verwendung von jeweils einem Vektor- und einem Insert-ständigen Primer wurden die Plasmide hinsichtlich der Orientierung des Inserts untersucht. Plasmide, bei denen das inserierte DNA-Fragment in reverser Orientierung im Vektorrückgrat vorlag, wurden anschließend sequenziert.

Durch blunt-end Klonierung der fünf Subfragmente in den pSMART-LCKan Vektor entstanden folgende Plasmide: pS(MNV)-1, -2, -3, -4, und 5, mit jeweils überlappenden Sequenzabschnitten an den 3' und 5' – Enden.

Das MNV-1 Plasmid enthielt die Nukleotidsequenz (nt) 70-2552 des MNV-Genoms mit einer *HpaI*-Schnittstelle am 5'- Ende und einer *SbfI*-Schnittstelle am 3'- Ende. Das Plasmid MNV-2 beinhaltet den Sequenzbereich von 2302-3473 nt und am 5'- Ende eine Schnittstelle für das Enzym *SbfI*. Am 3'- Ende von MNV-2 befand sich eine *SphI*-Schnittstelle. Das Plasmid MNV-3 umfasste den Genombereich von 3264-5117 nt und besaß am 5'-Ende eine *SphI*-Schnittstelle sowie am 3'- Ende eine *AgeI*-Schnittstelle. Das Plasmid MNV-4 enthielt die Nukleotidsequenz 4780-6278 mit einer *AgeI*-Schnittstelle am 5'- Genomende und einer *ApaI*-Schnittstelle am 3'- Ende. Das fünfte Konstrukt, MNV-5 (5599-7405 nt), besaß am 5'- Genomende eine *ApaI* und am 3'- Ende eine *NotI*-Schnittstelle. Diese fünf Subklone wurden mit den dazugehörigen Restriktionsstellen so konzipiert, dass das Zusammenfügen über eine kurze überlappende Nukleotidsequenz erfolgen konnte.

Bei der Sequenzanalyse der Plasmide detektierte Mutationen wurden über eine gerichtete Mutagenese mittels QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg) oder über eine Extensions-PCR unter Verwendung von Mutagenese-Primern und anschließender Ligation in das entsprechende Vektorkonstrukt korrigiert (3.4.5).

4.2.3 Zusammenbau des rekombinanten MNV cDNA-Klons

Die Subklone pMNV-1 und pMNV-2 besaßen den größten Nukleotidanteil der Nichtstrukturproteine, z.B. das VPg oder die NTPase. Das Zusammenfügen von Fragment 1 und Fragment 2 wurde durch den Verdau beider Plasmide mit *SbfI* erreicht, da sich diese Restriktionsstelle auf beiden Konstrukten befand (Abbildung 4.10A). Als Schnittstelle im Vektorrückrat diente das Restriktionsenzym *AsiI*. Dieser Doppelverdau führte zu einer Fragmentierung von pMNV-1 in zwei Banden. Dabei entstanden 3097 bp und 1405 bp große Teilstücke. Der Verdau des Plasmids pMNV-2 führte ebenfalls zu einer Spaltung des Plasmids in zwei Teile, mit 2388 bp und 796 bp Länge. Durch ein präparatives Agarosegel wurden anschließend die unterschiedlich großen Fragmente aufgetrennt (Abbildung 4.10B).

Da das Subfragment aus pMNV-2 den größten Vektoranteil an pSMART-LCKan besaß, wurde es vor dem Ligationsschritt dephosphoryliert (3.3.8), um das Auftreten von Re-Ligationen und falsch-positiv Klonen zu minimieren. Nach der Dephosphorylierung wurden beide Restriktionsansätze auf ein präparatives Agarosegel gegeben und die gewünschten DNA-Fragmente konnten extrahiert und ligiert werden (Abbildung 4.10C). Chemisch kompetente One Shot® *Stbl3™ E. coli*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit dem Ligationsansatz transformiert. Acht gewachsene Klone wurden auf LB-Agar mit Kanamycin ausgestrichen, um am Folgetag die DNA mittels Qiagen Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) zu extrahieren. Die Plasmide wurden im Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmidgröße konnte via supercoiled DNA Marker (Invitrogen, Karlsruhe) bestimmt werden. Korrekte Plasmide besaßen eine Größe von 5453 bp.

Durch Sequenzierung des neuen Subklones pMNV1+2 sollte als nächstes festgestellt werden, ob während der Prozedur ungewünschte Mutationen aufgetreten sind. Dazu wurden die positiven Klone mit den entsprechenden Primern (2.3.6) versehen und sequenziert.

Von einem korrekten Plasmid wurde für die weiteren Arbeiten eine Midi-Präparation durchgeführt.

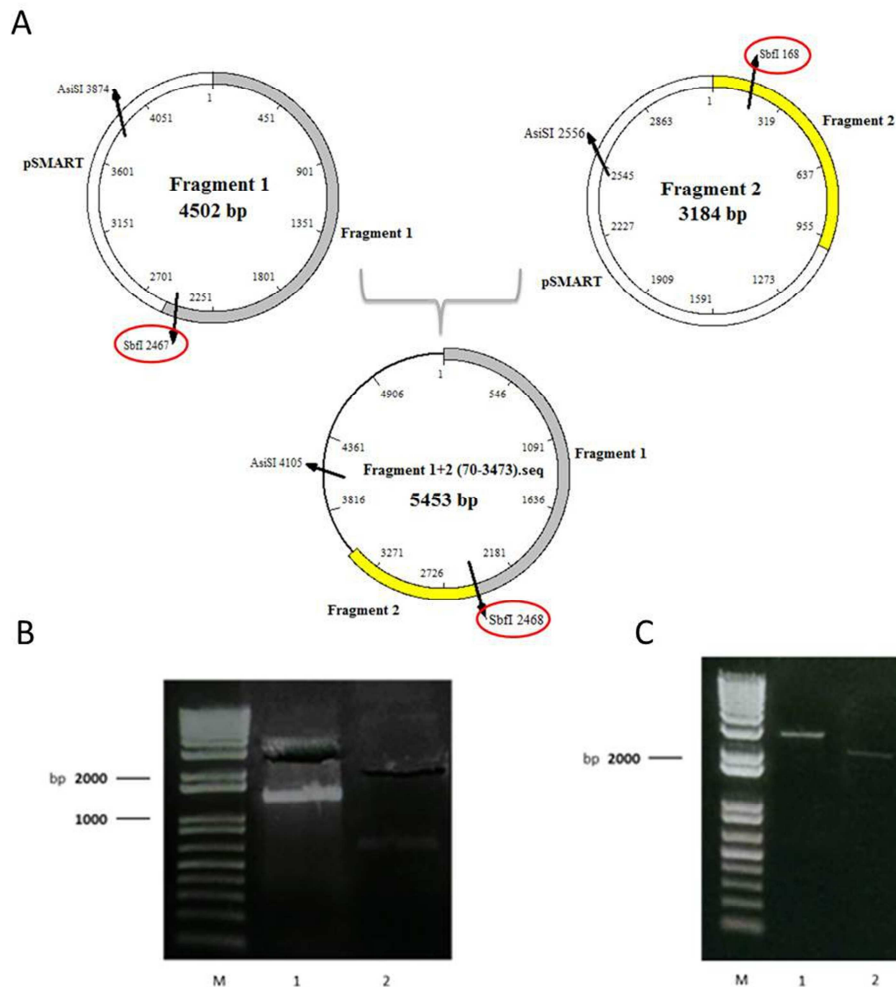


Abb. 4. 10: Zusammenbau von Fragment 1 und Fragment 2.

(A) Schematische Darstellung der Konstrukte mit den entsprechenden Restriktionsstellen *SbfI* und *AsiSI*. (B) Auftrennung der Restriktionsansätze im präparativen Agarosegel und Extraktion. M: Molekulargewichtsmarker. (C) Agarosegel nach der Aufreinigung der beiden Fragmente und vor der Ligation. M: Molekulargewichtsmarker I.

Im folgenden Arbeitsschritt wurde der Subklon pMNV1+2 mit dem nächsten Subklon pMNV-3 verbunden. Das Plasmid pMNV-3 beinhaltet den codierenden Sequenzabschnitt für die Nichtstrukturproteine RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) und Protease.

Über die gemeinsame Schnittstelle *SphI*, die sich auf beiden Konstrukten in einem kurzen überlappenden Sequenzabschnitt befand und *AsiSI*, als Schnittstelle im Vektorrückrat, wurden beide Plasmide in einem Doppelverdau zunächst segmentiert. Einen schematischen Überblick dazu liefert Abbildung 4.11A. Plasmid pMNV1+2 wurde in zwei Fragmente mit einer Größe von 3976 bp und 1477 bp geteilt. Das Plasmid pMNV-3 besaß den größten Vektoranteil, einschließlich der Kanamycin-Resistenz, so dass vor der Ligation eine Dephosphorylierung des Konstrukts durchgeführt wurde (3.3.8). Das Plasmid pMNV-3 wurde dadurch in zwei Fragmente mit den Größen 3121 bp und 713 bp

gespalten. Nach der Auftrennung der Fragmente in einem präparativen Agarosegel (3.3.3.4) und der Extraktion der jeweils größten Banden (Abbildung 4.11B) erfolgte die Ligation mittels T4 DNA-Ligase (3.4.3). Chemisch kompetente One Shot® Stbl3™ *E. coli*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit den Ligationsansätzen transformiert. Am Folgetag wurden acht Klone auf LB-Agar mit Kanamycin ausgestrichen. Es folgte eine DNA Mini-Präparation (3.3.1). Korrekte Klone wurden über ihre Größe (7097 bp) via Agarosegel bestimmt (Abbildung 4.11C) und sequenziert. Wenn keine Mutation bei einem der Klone identifiziert wurde, konnte mit dem neuen Subklon pMN1-2-3, der nun den vollständigen Sequenzbereich der Nichtstrukturproteine umfasste, weitergearbeitet werden.

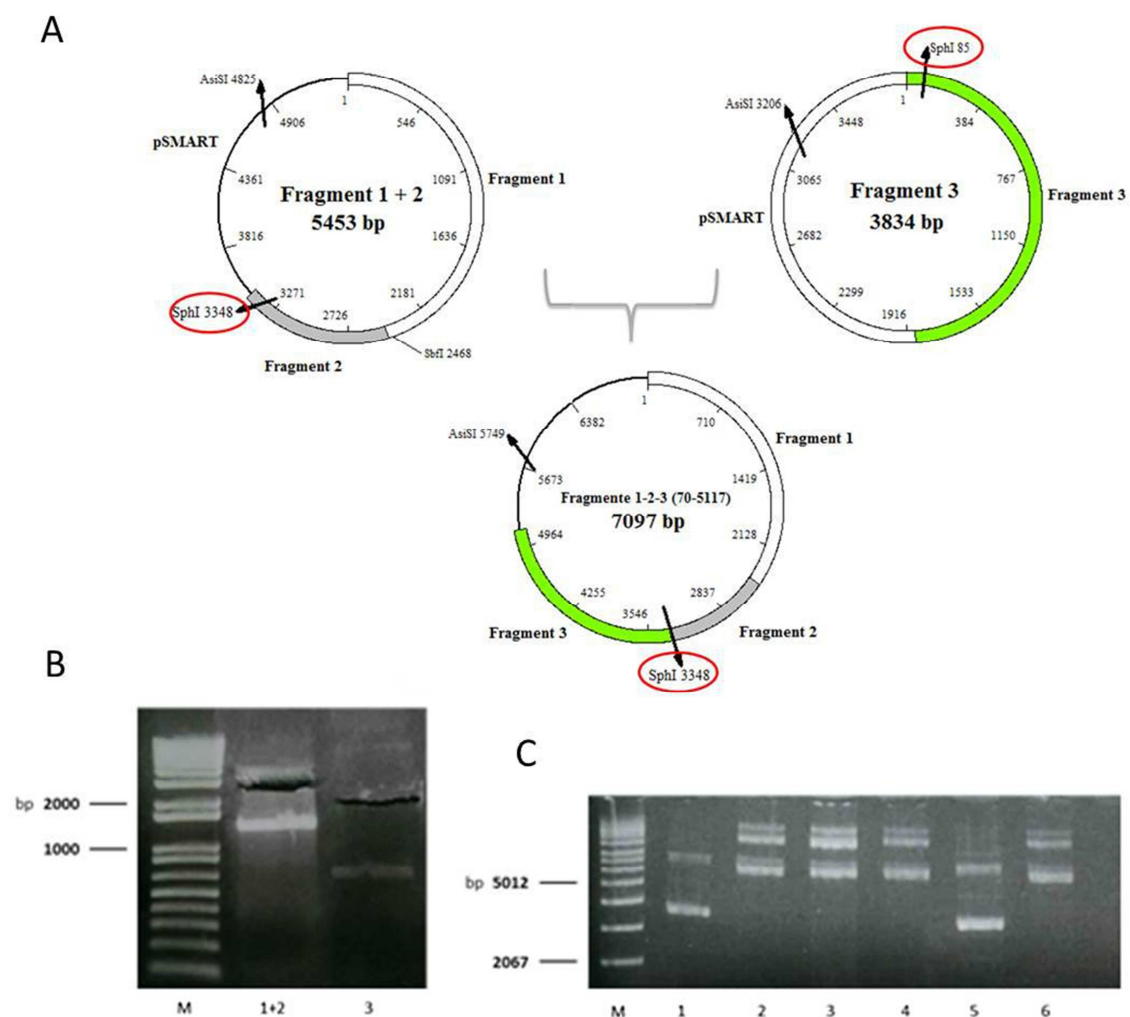


Abb. 4. 11: Zusammenbau von Fragment 1-2 mit Fragment 3.

(A) Schematische Darstellung der Konstrukte mit den entsprechenden Restriktionsstellen *SphI* und *AsiSI*. (B) Auftrennung der Restriktionsansätze im präparativen Agarosegel und Extraktion. M: Molekulargewichtsmarker I. (C) Auftrennung von sechs gewachsenen Klonen im Agarosegel, um deren Größe zu analysieren. Klone 2,3,4 und 6 wurden sequenziert, Klone 1 und 5 verworfen. M: Molekulargewichtsmarker IV.

Als nächstes wurden Fragmente 4 und Fragment 5 miteinander verbunden. Beide beinhalteten den Bereich der Strukturproteine, welche ORF2 und ORF3 codieren. Über eine *Apal*-Schnittstelle wurden die beiden Konstrukte zusammengefügt. Eine schematische Darstellung des Klonierungsvorgangs ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Als Schnittstelle im Vektorrückrat diente erneut das Enzym *AsiI*. Alle weiteren Arbeitsschritte waren mit denen der vorher beschriebenen Teilkclone identisch. Durch einen korrekt sequenzierten Subklon pMNV4-5 konnte anschließend der Gesamtklon generiert werden.

Zudem fungierte der Subklon pMNV4-5 als Template für Mutagenesestudien am subgenomischen Promotor. Dieses vergleichsweise kleine Plasmid war mit 4584 bp wesentlich leichter zu handhaben, als der full-length cDNA-Klon. Auch das Auftreten von Neu-Mutationen im gesamten MNV-Genom wurde auf diese Weise reduziert.

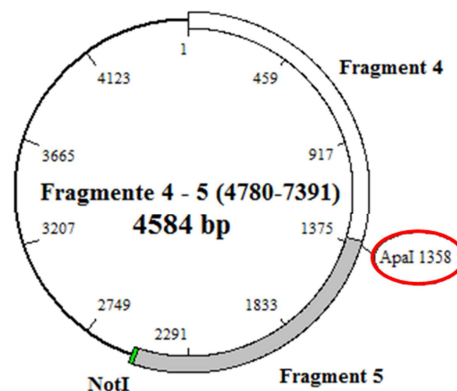


Abb. 4. 12: Zusammenbau von Fragment 4 mit Fragment 5.

Schematische Darstellung des neugebildeten Subklons aus Fragment 4 und Fragment 5 mit der verbindenden Restriktionsstelle *Apal*. Dieser Subklon umfasst den Bereich der Strukturproteine, ORF2 und ORF3.

Der folgende Arbeitsschritt im Zusammenbau des MNV-Vollklons bestand daraus, die Subklone pMNV1-2-3 und pMNV4-5 über ihre gemeinsame Schnittstelle *AgeI* zu verbinden (Abbildung 4.13A). Ein Doppelverdau mit den beiden Enzymen *AsiI* u *AgeI* führte zu einer Spaltung des Plasmids pMNV1-2-3 in zwei Fragmente, die eine Größe von 6327 bp und 1348 bp basierten. Das Plasmid pMNV4-5 wurde durch *AsiI* u *AgeI* auch in zwei Teile, 3036 bp und 1548 bp groß, gespalten. Da das Plasmid pMNV1-2-3 den größten Vektoranteil trug, folgte eine Dephosphorylierung (3.3.8). In einem präparativen Agarosegel wurden die jeweils größten Fragmente extrahiert (Abbildung 4.13B) und durch die T4-Ligase des Rapid DNA Ligation Kits (Thermo Scientific, Dreieich) miteinander ligiert (3.4.3). Chemisch kompetente One Shot® Stbl3™ *E. coli*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) wurden mit

den Ligationansätzen transformiert. Am Folgetag konnten acht Klone auf LB-Agar mit Kanamycin ausgestrichen und sequenziert werden. Das anschließend fehlerfrei sequenzierte Plasmid besaß eine Größe von 9390 bp und bildete den fast vollständigen full-length cDNA-Klon.

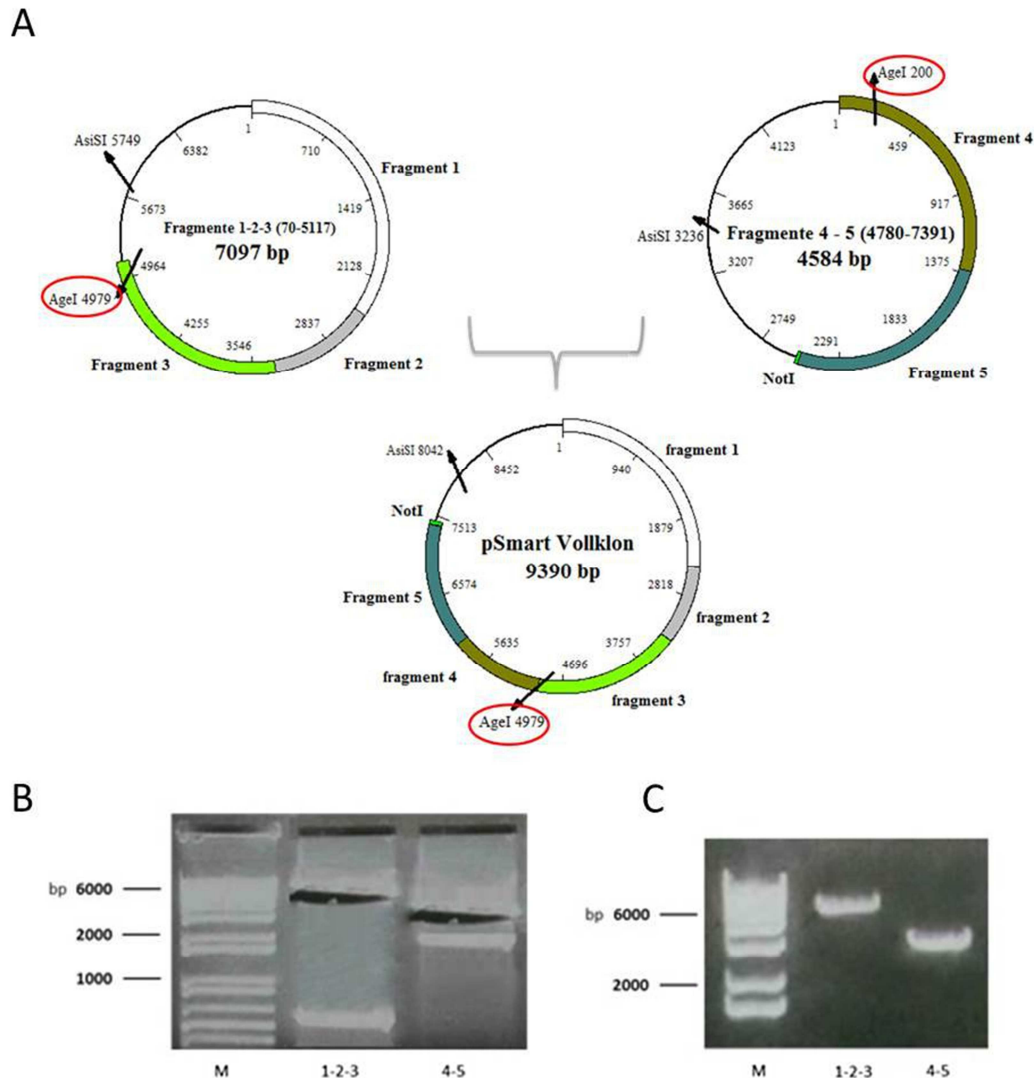


Abb. 4. 13: Zusammenbau des full-length cDNA-Klons.

(A) Schematische Darstellung der einzelnen Konstrukte mit den entsprechenden Restriktionsstellen *AgeI* und *AsiSI*. (B) Auftrennung der beiden Restriktionsansätze im präparativen Agarosegel und Extraktion der benötigten Banden. M: Molekulargewichtsmarker I. (C) Agarosegel nach der Aufreinigung der beiden Fragmente und vor der Ligation zum Gesamtklon. M: Molekulargewichtsmarker I.

4.2.4 Insertion des 5'- Genomendes mit T7-Promotor

Als letzter noch fehlender Teil des MNV cDNA-Klons wurde der T7-Promotor mit dem 5'- Genomende des MNV inseriert. Der T7-Promotor diente später der *in-vitro* Transkription, um infektiöse genomische full-length RNA herzustellen. Außerdem wurde eine zusätzliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym *AarI* vor dem T7-Promotor inseriert. Das MNV-Genom des cDNA-Klons wurde dadurch von beiden Seiten durch Endonukleasen flankiert und war so leichter zugänglich für die nachfolgenden Mutagenesestudien.

Acht speziell designte 50mer Oligonukleotide mit jeweils 20 nt Überlappung dienten in einem PCR-Ansatz als Template für einen einzelnen Amplifikationszyklus mittels Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt/Main). Nach der Aufreinigung des Amplifikates wurde eine Extensions-PCR mit diesem Produkt als Template in drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Als Primer wurden nur die beiden äußeren phosphorylierten Primern verwendet. Die drei Amplifikate der Extensions-PCR sind in Abbildung 4.14B dargestellt. Ein schematischer Überblick des 5'- Genomendes ist in Abbildung 4.14A gezeigt.

Die Produkte wurden in einem präparativen Agarosegel aufgereinigt und blunt-end in das pSMART LCKan Vektorsystem (Lucigen, Middleton) kloniert. Der Subklon wurde als pMNVT7-AarI bezeichnet. Ein korrekt sequenzierter, positiver Subklon wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen *MluI* und *AsiI*, als vektorständige Schnittstelle, verdaut. Das entsprechende Fragment wurde in den MNV cDNA-Klon ligiert.

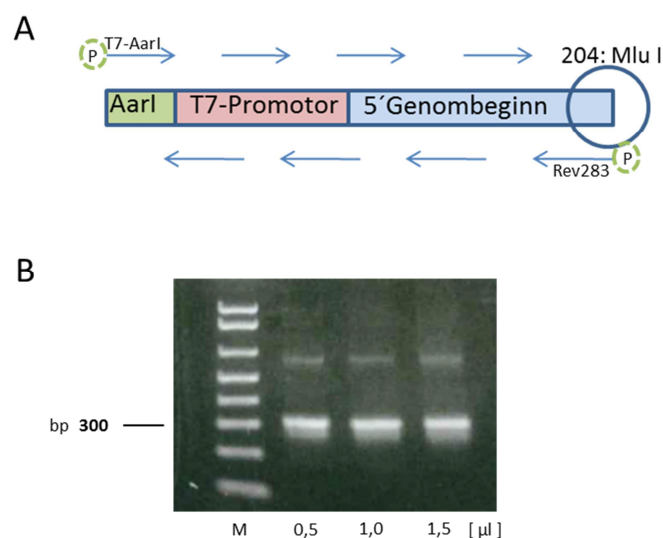


Abb. 4. 14: Insertion 5'- Genomende und T7-Promotor.

(A) Schematische Darstellung der acht überlappenden Primer einschließlich der zwei phosphorylierten Außenprimer. Vor dem T7-Promotor war eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle von *AarI* lokalisiert. Es folgte der T7-Promotor und die ersten 283 Nukleotide des MNV-Genoms. Über das natürlich vorkommende Enzym *MluI* erfolgte die Ligation an den Gesamtklon. (B) Abbildung der Amplifikate aus der zweiten PCR im Agarosegel. Es wurden 0,5 µl; 1,0 µl; und 1,5 µl Template aus Runde 1 benutzt. M: Molekulargewichtsmarker, 100bp-Intervalle.

4.2.5 Insertion eines genetischen Markers

Als abschließende Konstruktion am MNV-Gesamtklon wurde ein genetischer Marker eingefügt, um in den folgenden Arbeiten stets zwischen MNV Wildtyp-Virus und rekombinanten MNV unterscheiden zu können. Eine Punktmutation von Guanin zu Adenin bildete die neue, einmalige Restriktionsstelle *RsrII* an Position 209 im MNV-Genom, so dass durch einen Verdau mit diesem Enzym eine Fragmentierung der DNA einsetzte. Einen schematischen Überblick des cDNA-Klons mit allen Insertionen liefert Abbildung 4.15A.

Für die Insertion des genetischen Markers wurde eine Mutagenese-PCR mit zwei 30mer Primern durchgeführt (3.4.5). Der gewünschte Basenaustausch wurde auf den Mutagenese-Primern jeweils zentral lokalisiert. Als Template diente das Plasmid pMNV7-AarI. Die in der ersten PCR-Runde entstandenen zwei Amplifikate waren das Template für eine zweite Extensions-PCR. Diesmal mit zwei phosphorylierten Außenprimern, wodurch später eine blunt-end Klonierung des Inserts in den pSMART LCKan Vektor (Lucigen, Middleton) ermöglicht wurde. Abbildung 4.15B zeigt das präparative Agarosegel mit dem Produkt der Extensions-PCR und dessen Extraktion. Chemisch kompetente One Shot® *Stbl3™ E. coli*-Bakterien (Invitrogen, Karlsruhe) wurden transformiert und die gewachsenen Klone auf die gewünschte Punktmutation durch Sequenzierung überprüft. Ein positiver Klon wurde anschließend über die *MluI*-Schnittstelle im MNV-Genom und *AsiSI*, als vektorständiger Schnittstelle, mit dem Gesamtklon verbunden.

Der MNV full-length Klon konnte nun zur Herstellung rekombinanter muriner Noroviren eingesetzt werden.

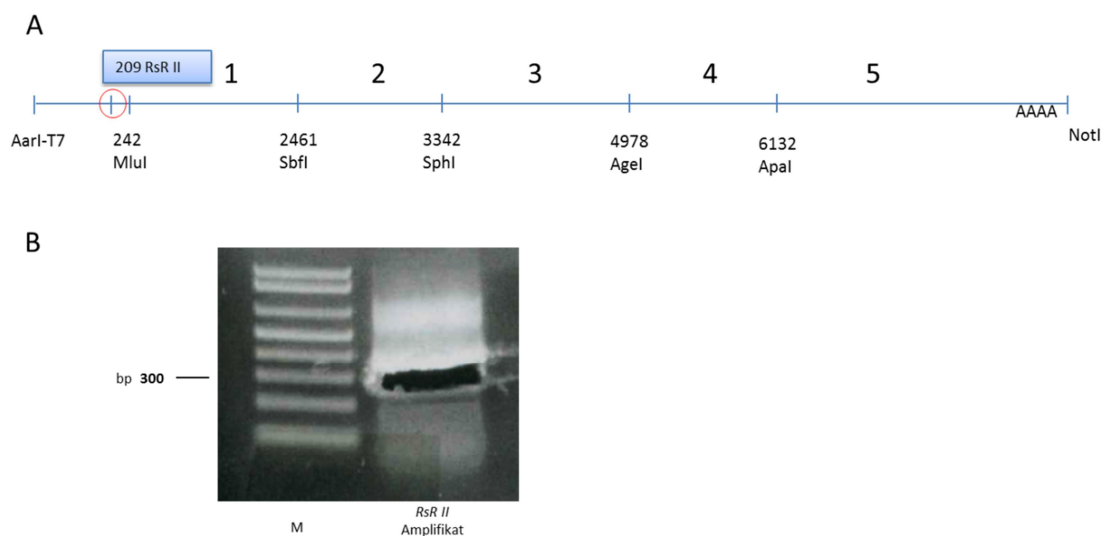


Abb. 4. 15: Insertion des genetischen Markers.

(A) Schematische Darstellung des genetischen Markers im MNV Genom und Überblick des full-length cDNA-Klons nach Beendigung aller notwendigen Klonierungen. (B) Auftrennung der Extensions-PCR im präparativen Agarosegel und Extraktion des Produktes. M: Molekulargewichtsmarker I, 100bp-Intervalle.

4.2.6 Produktion rekombinanter muriner Noroviren

Der full-length MNV cDNA-Klon diente als Template für die Herstellung infektiöser viraler RNA. Da die T7-Polymerase lineare DNA-Templates für die *in-vitro* Transkription benötigt, wurde das Plasmid zunächst über die *NotI* Schnittstelle, welche sich hinter dem polyA-Schwanz befand, linearisiert (3.3.6). Das linearisierte Plasmid wurde anschließend über eine Ethanol-Fällung aufgereinigt (Abbildung 4.16A) und im Agarosegel auf die Vollständigkeit der Reaktion geprüft. Die *in-vitro* Transkription der genomischen full-length RNA wurde danach wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben, durchgeführt. Das erhaltene *in-vitro* Transkript wurde mittels DNase verdaut und mit Lithiumchlorid gefällt, um alle Plasmid-Rückstände vollständig zu entfernen. In Abbildung 4.16B ist das aufgereinigte Transkript in einem nichtdenaturierenden Agarosegel dargestellt. Auf die Verwendung eines spezifischen RNA-Markers wurde verzichtet.

Die virale genomische RNA war gecapped und konnte nun in BHK-J Zellen elektroporiert werden (3.1.2). BHK-J Zellen sind nicht suszeptibel für eine MNV-Infektion, konnten aber trotzdem so effizient elektroporiert werden, dass sie lebensfähige Viren in den Zellkulturüberstand produzierten. Nach 24 h wurde dieser Überstand auf suszeptible RAW264.7 Zellen transferiert. Die Virusreplikation wurde durch das Ansteigen viraler RNA im Zellkulturüberstand nachgewiesen und mittels Real-Time RT-PCR vermessen (3.5.6). Eine typische Wachstumskurve des rekombinanten MNV (rMNV) im Vergleich mit dem Wildtyp-Virus ist in Abbildung 4.16C dargestellt.

Die Produktion der MNV-Stocklösungen wurde nach drei bis vier Tagen beendet, da das Virus an diesem Punkt das Optimum erreichte. Durch einen Plaque-Assay auf RAW264.7 Zellen wurden die Virusstocks quantifiziert (3.1.6). Der resultierende Virustiter lag im Durchschnitt bei 10^7 PFU/ml. Abbildung 4.16E zeigt keinen Unterschied in der Plaque-Morphologie zwischen Wildtyp und rekombinanten MNV.

Um sicherzustellen, dass das Virusstock auch tatsächlich rekombinantes MNV enthält und nicht durch eine Wildtyp-Kontamination produziert wurde, wurde eine One-Step RT-PCR durchgeführt. Die ersten 500 Nukleotide des MNV-Genoms wurden amplifiziert. Der anschließende Verdau des Produktes mit dem genetischen Marker *RsrII* zeigte für das rekombinante MNV zwei Fragmente im Agarosegel. Der MNV-Wildtyp wies dagegen nur eine einzelne Bande auf (Abbildung 4.16D).

Alle rekombinanten Viren der Arbeit wurden auf diese Art charakterisiert.

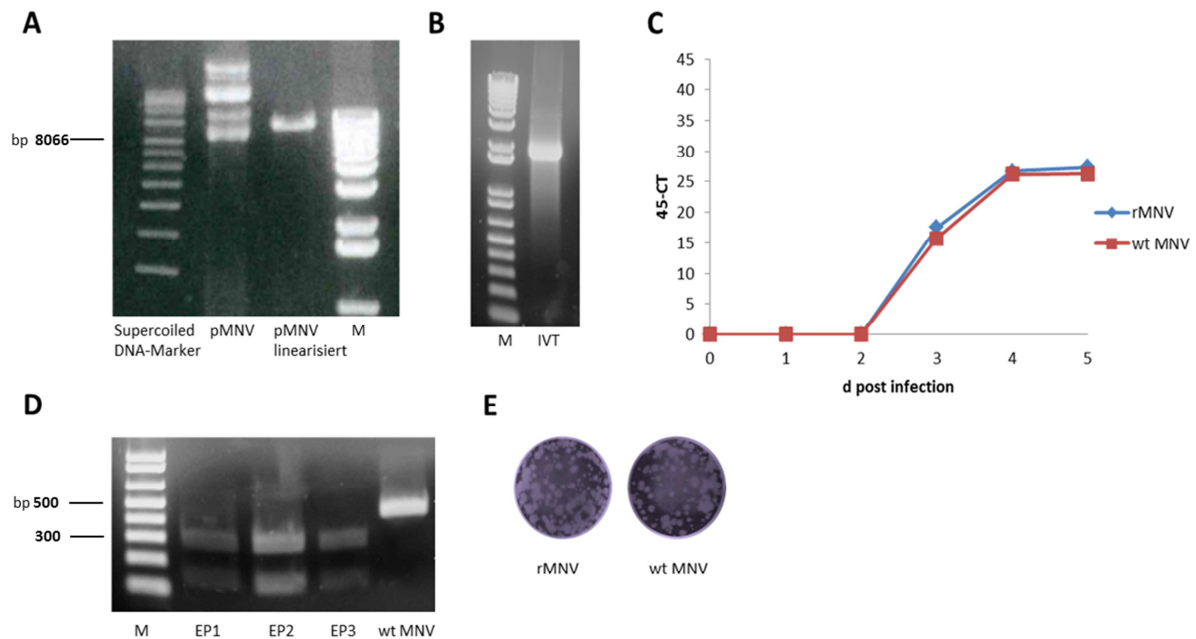


Abb. 4. 16: Herstellung rekombinanter Viren durch prMNV.

(A) Darstellung des full-length cDNA-Klons als Plasmid und linearisiert durch *NotI* im Agarosegel. M: Molekulargewichtsmarker IV. (B) *In-vitro* Transkript des rMNV als gepappte RNA mit polyA-Schwanz. M: Molekulargewichtsmarker I. Auf die Verwendung eines spezifischen RNA-Markers wurde verzichtet. Der verwendete DNA-Marker erlaubt keine Bestimmung der Molekülmasse. (C) Vergleich der Virusreplikation zwischen Wildtyp und rekombinanten MNV. RAW264.7 Zellen wurden mit einer MOI von 0,001 infiziert. Das Viruswachstum wurde über Real-Time RT-PCR bestimmt. (D) Ein Restriktionsverdau der ersten 500 Nukleotide des rMNV und des WT mit dem genetischen Marker *RsrII* wurde durchgeführt. EP1-EP3 stellen einen Dreifachansatz des rekombinanten MNV dar. M: Molekulargewichtsmarker I, 100bp-Intervalle. (E) Ein Plaque-Assay mit anschließender Kristallviolett-Färbung zeigte keinen Unterschied in der Plaque-Morphologie beider Viren.

4.3 Transfektion verschiedener Zelllinien mit rMNV

Um optimale Transfektionsbedingungen für das Arbeiten mit dem rekombinanten murinen Norovirus zu bestimmen, wurden verschiedene Zelltypen getestet. Da eine hohe Interferonsensitivität für dieses Virus besteht [18], wurden Zelllinien gesucht, bei denen eine Störung in der Regulation der Immunantwort vorlag. Also Interferon-defiziente Zellen. Diese sollten jedoch stabil genug sein, um den Auswirkungen einer Transfektion standzuhalten.

Von Dr. rer. nat. Winfried Barchet, Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie des Uniklinikums Bonn, habe ich für diesen Zweck sechs Maus-Primärzelllinien erhalten. Sie besaßen entweder einen Knock-Out für MDA-5 oder RIG-I. Beide zählen zu der Enzymgruppe der Helikasen und gehören zu den intrazellulären Rezeptoren für einzel- oder doppelsträngige RNA des angeborenen Immunsystems. MDA-5 erkennt doppelsträngige RNA ab einer Größe von ca. 2000 Nukleotiden. RIG-I detektiert zusätzlich auch einzelsträngige RNA mit einem Triphosphat am 5'-Ende. Diese Triphosphat-RNA wird von viralen Polymerasen produziert und kommt in gesunden eukaryotischen Zellen nicht vor. Dadurch kann der Rezeptor zwischen zelleigener RNA und viraler RNA unterscheiden und bei Virus-Befall eine Immunantwort auslösen.

4.3.1 Immortalisierung und Subklonierung von MEFs

Die Immortalisierung von Maus-Primärzellen erfolgte über eine lentivirale Transduktion des großen T-Antigens von Simian Virus 40 [158]. Die Lentiviren wurden mit einer MOI von 10 auf die Zellen einer 6-Well Platte gegeben und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert (3.1.7). Die Zellen konnten anschließend passagiert bzw. subkloniert werden.

Die Subklonierung der immortalisierten Mausfibroblasten wurde in Kapitel 3.1.8 detailliert beschrieben. Das Ziel war, die verschiedenen Zelllinien so stark mit Selektionsmedium auf einer 96-Well-Platte zu verdünnen, dass Einzelklone entstehen. Jeweils vier morphologisch unterschiedliche Subklone einer Zelllinie wurden nach 14-21 Tagen in eine 24-Well Platte überführt, sukzessiv weiter expandiert und im ELISA-Test auf das jeweilige Knock-Out untersucht. Dieser Immunassay wurde freundlicherweise von der AG Barchet durchgeführt. Tabelle 4.3 zeigt eine Übersicht der analysierten Zelllinien. In Abbildung 4.17 sind die Ergebnisse des ELISA-Tests mit der Messung der Interferon- α Konzentration dargestellt, einem antiviralen Signalprotein Typ I. Als Immunostimulant wurden Poly I:C und IVT4 verwendet. Poly I:C ist die Abkürzung für Polyinosinic:polycytidylic acid und wird in seiner Form als Natriumsalz eingesetzt, um Virusinfektionen in Zellen zu simulieren. Es ist ein synthetisches Analog zu doppelsträngiger RNA, wie sie in manchen Viren vorkommt und interagiert dadurch mit dem Toll-ähnlichen Rezeptor (TLR). IVT4 steht für *in-vitro* Transkript 4, eine RNA die einen Hairpin formt und ein 5'-Triphosphat Ende besitzt⁴, also ein RIG-I Ligand.

Tab. 4.3: Übersicht der subklonierten Mausfibroblasten Zelllinien.

Insgesamt wurden drei Mda-5 k.o. und 7 RIG-I k.o. Zelllinien generiert (-). Für jede Knock-Out Zelllinie war auch der entsprechende Wildtyp (+) vorhanden. Die Zahl in der runden Klammer bezeichnet die Nummer des Subklons.

Zelllinie WT		Zelllinie k.o.	
Mda-5 (2)	+	Mda-5 (1)	-
Mda-5 (3)	+	Mda-5 (2)	-
Mda-5 (4)	+	Mda-5 (4)	-
RIG-I 12 (2)	+	RIG-I 10 (1)	-
RIG-I 12 (4)	+	RIG-I 10 (2)	-
RIG-I 12 (6)	+	RIG-I 10 (5)	-
		RIG-I 10 (6)	-
RIG-I 13 (1)	+	RIG-I 11 (1)	-
RIG-I 13 (2)	+	RIG-I 11 (2)	-
RIG-I 13 (5)	+	RIG-I 11 (6)	-

⁴ Sequenz IVT4:

pppGGGACGCUGACCCAGAAGAUCUACUAGAAAUAGUAGAUCUUCUGGGUCAGCGUCCC

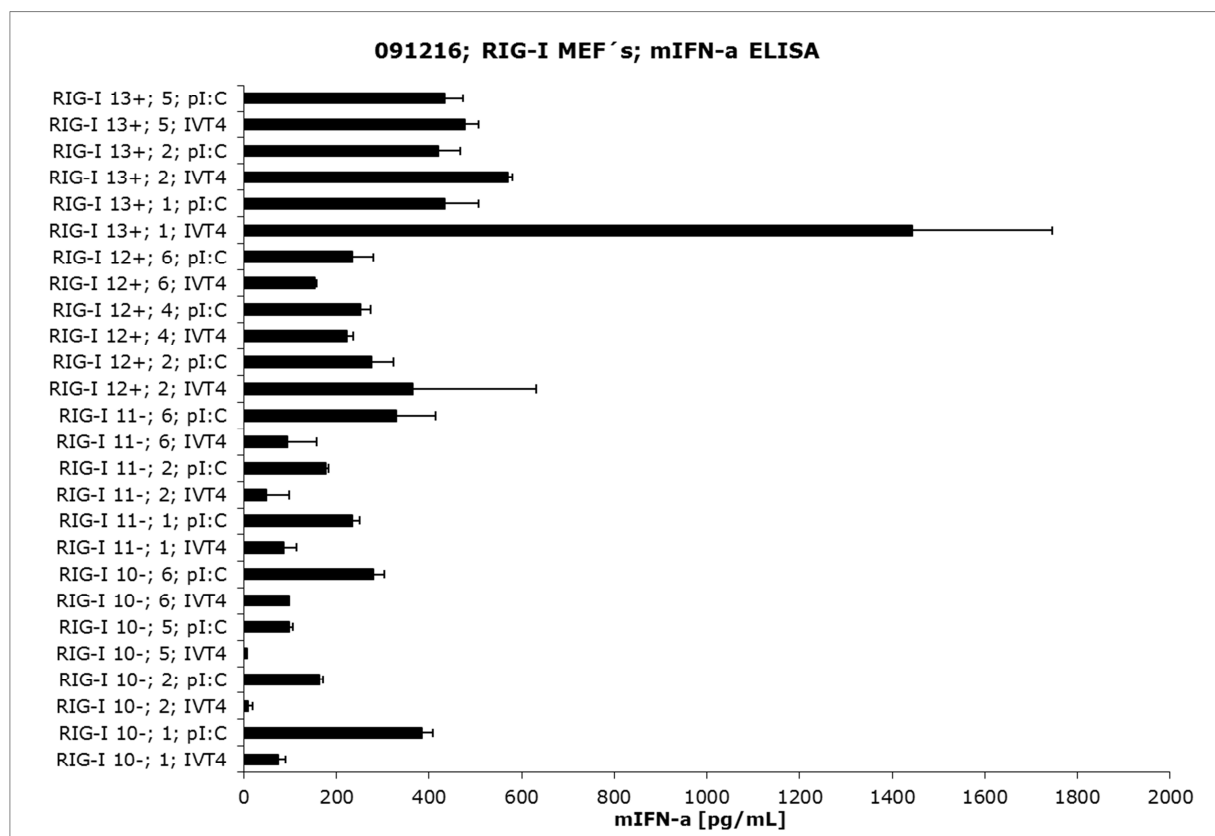
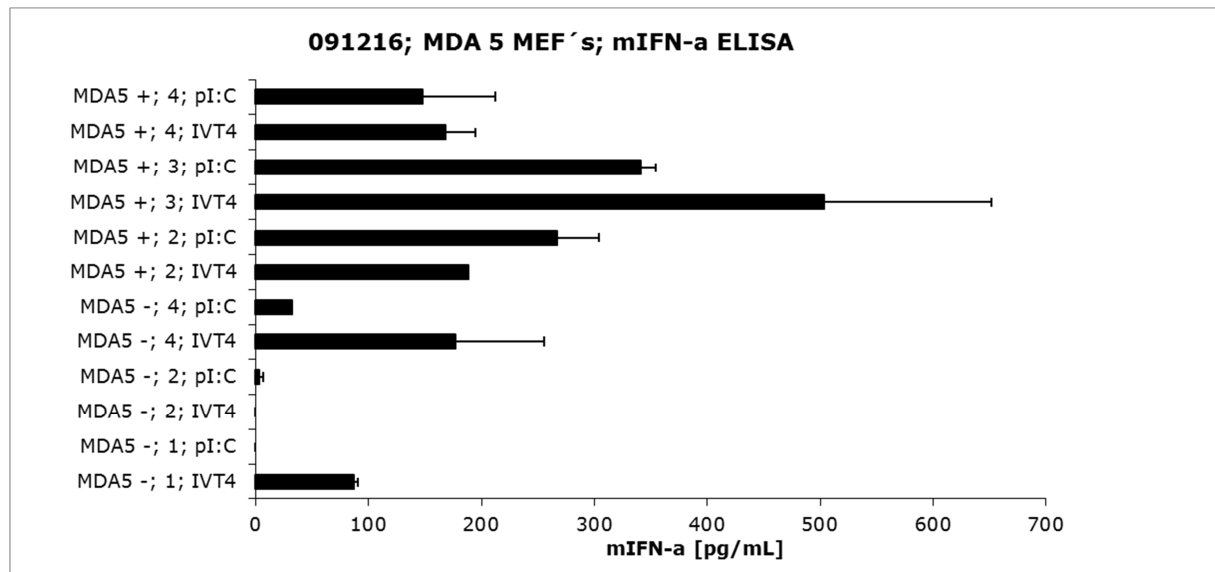


Abb. 4. 17: Analyse der Mda-5/RIG-I +/- Zelllinien.

Jede Zelllinie wurde mit Poly I:C und IVT4 als Immunostimulant via ELISA analysiert. Auf der x-Achse ist der Mittelwert der Konzentration an Interferon- α dargestellt. Auf der y-Achse sind die verschiedenen Subklone angeordnet.

Dieser ELISA-Test zeigte, dass alle k.o. Zelllinien im Vergleich mit dem Wildtyp entweder keine oder nur eine geringe Konzentration an Interferon- α (IFN- α) produzieren. Was für den Fall einer Virusinfektion bedeutete, dass das Virus nicht von den k.o. Zelllinien erkannt wurde. Es konnte sich ungehindert vermehren, da der JAK-STAT Signalweg nicht aktiviert war. Die Zellen wurden demzufolge nicht in den antiviralen Status versetzt.

Die Wildtyp-Zellen (Mda-5 +/- RIG-I +) dagegen produzierten durch die Stimulierung mit IVT4 eine Interferon- α Konzentration von bis zu 1800 pg/mL. Diese Zellen befanden sich im antiviralen Status.

Knock-Out-Zelllinien mit der geringsten gemessenen IFN- α Konzentration wurden für die nachfolgenden Transfektionsversuche ausgewählt. RIG-I 10 (-) Subklon 5 und Mda-5 (-) Subklon 2 wurden deshalb in der Zellkultur expandiert. RIG-I 13 (+) Subklon 1 und Mda-5 (+) Subklon 3 wurden als Kontrollzelllinien bestimmt.

Direkte Infektionsversuche der MEFs mit MNV blieben erfolglos, so dass ein Effekt dieser Zellen auf die Replikation nur über indirekte Transfektionsexperimente analysiert werden konnte.

4.2.3 Transfektion der subklonierten MEFs

Um den Einfluss der Mausfibroblasten auf eine Infektion mit rekombinanten MNV zu untersuchen, wurden BHK-J-Zellen als Vergleichszelllinie getestet. Diese Hamsternieren-Zelllinie war einfach in der Handhabung, robust und effizient transfizierbar. Als susceptible Zelllinie für MNV-Infektionen dienten RAW264.7 Zellen, welche aber nicht effizient transfizierbar waren.

Ein typisches Elektroporationsprotokoll ist in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Alle verwendeten Zelllinien wurden am Vortag eingesät. Jede Elektroporation wurde mit 2×10^7 Zellen und 3 μ g gecappter RNA des rMNV durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen zunächst dreimal bei -80 °C eingefroren und wieder aufgetaut, um so ein „Aufknacken“ zu erzielen. Die Virus-RNA gelangte dadurch in den Überstand und wurde nach einem kurzen Zentrifugationsschritt auf RAW264.7 Zellen überführt.

Als erstes wurde eine Wachstumskurve für alle Elektroporationsansätze der verschiedenen Zelllinien erstellt. RAW264.7 Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 mit den verschiedenen Elektroporationsüberständen infiziert. Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden einmal täglich jeweils 200 μ l Überstand geerntet. Die RNA wurde anschließend mittels QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert und durch Real-Time RT-PCR analysiert (3.4.12). Abbildung 4.18 zeigt eine Zusammenfassung der Transfektionsversuche.

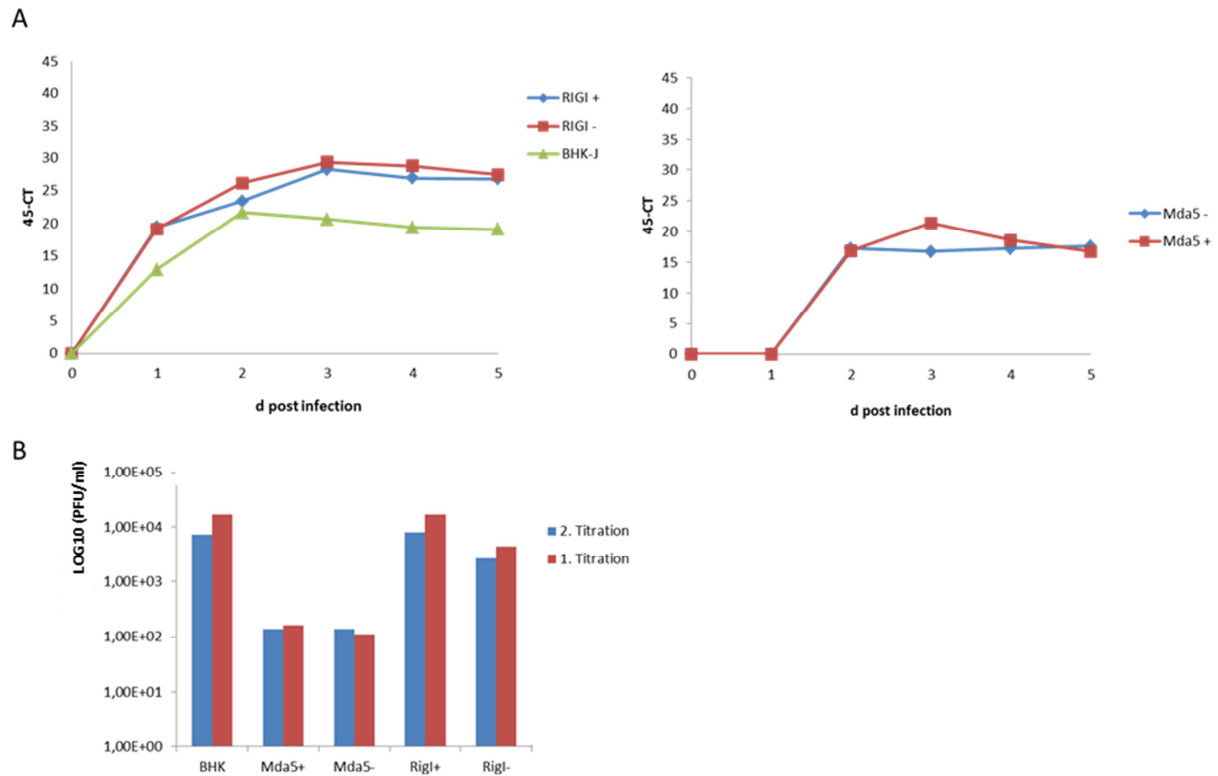


Abb. 4.18: Elektroporation der MEFs.

(A) Wachstumskurve des rMNV auf RAW264.7 Zellen. Vorher erfolgte die Elektroporation des rMNV in verschiedene „Helfer“-Zellen: RIG-I +/- , Mda-5 +/- und BHK-J. 24 h später wurden die Elektroporationsüberstände auf RAW264.7 Zellen transferiert und täglich 200 µl Überstand geerntet. Nach der RNA-Extraktion wurde über Real-Time RT-PCR das Viruswachstum gemessen. (B) Bestimmung der PFU/ml durch Titration der Überstände auf RAW264.7 Zellen im Doppelansatz.

Die Experimente zeigten, dass durch den Einsatz der Mausfibroblasten als eine Art „Helferzellen“ bei der Elektroporation, kein vorteilhafter Einfluss auf die Replikation ausgeübt wurde. Die Wachstumskurven für MEFs mit RIG-I k.o. und Mda-5 k.o. zeigten keinen signifikanten Unterschied zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen. Beide Kinetiken lagen dicht beisammen. Die Elektroporation des rMNV in MEFs mit RIG-I oder Mda-5 k.o. führte zu keiner Zunahme im Viruswachstum. Im Vergleich zur Elektroporation von BHK-J Zellen zeigten MEFs nur geringfügig höhere CT-Werte (Abbildung 4.18 A).

Die Bestimmung der Plaque Forming Units (PFU) der Elektroporationsüberstände zeigte für BHK-J Zellen und RIG-I (+) Zellen die höchsten Titer mit ca. 1×10^4 PFU/ml (Abbildung 4.18 B). Zwischen Mda-5 (-) und (+) Zellen war kaum eine Differenz zu erkennen, bei einem eher niedrigen Titer von ca. 1×10^2 PFU/ml.

Schließlich konnte kein positiver Effekt auf das Viruswachstum durch die Elektroporation rekombinanter muriner Noroviren in MEFs, welche eine Störung im Signalweg besitzen, bestimmt werden. Die Elektroporation von BHK-J Zellen führte dagegen zu einem verhältnismäßig hohen Virustiter und zeigte eine stabile Kinetik. Für die weiteren Arbeiten wurden deshalb standardmäßig BHK-J Zellen als „Helferzellen“ für Transfektionen eingesetzt. Die PFU-Bestimmung der Elektroporationsreaktionen erfolgte stets über susceptible RAW264.7 Zellen.

4.4 Mutagenese-Studie des subgenomischen Promotors

4.4.1 Optimierungsarbeiten am reversen Genetiksystem

Auf Grund des relativ kleinen Genoms des murinen Norovirus und um über ein möglichst schnelles reverses Genetiksystem zu verfügen, wurde versucht das gesamte Virusgenom als ein einfaches PCR-Produkt zu amplifizieren und dadurch das bislang Plasmid-basierte, zeitaufwendige Arbeiten zu umgehen. Hierfür wurden Primer mit dem T7 RNA-Polymerase-Promotor am 5'-Genomanfang und dem polyA-Schwanz am 3'-Genomende verwendet (Tabelle 2.1 / 2.2).

Beide Methoden zur Generierung des DNA-Templates für die *in-vitro* Transkription, also linearisiertes Plasmid vs. PCR-Produkt, wurden nach der Transfektion in BHK-J Zellen über eine Wachstumskinetik via Real-Time RT-PCR miteinander verglichen (Abbildung 4.19 C). Dabei wurde ein leichter Vorteil im Viruswachstum auf Seiten des PCR-Produktes festgestellt. Eine Resequenzierung der rekombinanten Viren aus dem Überstand bestätigte die korrekten MNV-Vollgenome. Das über PCR generierte Template führte schließlich zu einer Steigerung der Effizienz des reversen Genetiksystems und war weniger zeitaufwändig in der Herstellung.

Um den Vorteil der Schnelligkeit und Stabilität auf eine Mutationsanalyse im Bereich des subgenomischen Promotors zu übertragen, wurde zunächst versucht ein full-length PCR-Produkt aus zwei Fragmenten zu generieren (Abbildung 4.19 B). Über spezifische Mutagenese-Primer sollten die Mutationen in das MNV-Genom eingeführt werden.

Das MNV-Genom wurde dafür in einer ersten PCR exakt an der Position, die mutagenisiert werden sollte, zweigeteilt. Mutagenese-Primer mit den gewünschten Basenaustauschen wurden designet und mit den beiden vektorständigen Primern SL1 bzw. SR2 in einer ersten PCR eingesetzt (Tabelle 2.3.5). Die durch ein präparatives Agarosegel aufgereinigten Produkte wurden in einer zweiten PCR mittels polyA-Primer und T7-Promotor Primer fusioniert. Nach einer Ethanolfällung erfolgte die *in-vitro* Transkription (3.5.1) des PCR-Produktes. Für die anschließende Elektroporation in BHK-J Zellen wurden jeweils 3 µg der RNA eingesetzt (3.1.2). Die Titration der Überstände wurde nach 24 h

Inkubationszeit auf suszeptiblen RAW264.7 Zellen durchgeführt. Das Wachstum der aus den verschiedenartig hergestellten Templates resultierenden Viren zeigte jedoch keinen großen Unterschied. In Abbildung 4.19D wurden die erhaltenen Virustiter miteinander verglichen.

Im weiteren experimentellen Verlauf dienten ausschließlich aufgereinigte PCR-Produkte als Template für die *in-vitro* Transkription. Alle Mutanten wurden über Extensions-PCRs mit den entsprechenden Mutagenese-Primern generiert und nicht wie bisher üblich, durch aufwendige Klonierungsarbeiten. Beide PCR-Runden wurden mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Frankfurt/Main) durchgeführt, um deren Schnelligkeit (15s/kb) und Proofreading-Funktion als weiteren Vorteil für diese Arbeiten zu nutzen. Sequenzierungen der full-length PCR-Produkte verliefen korrekt.

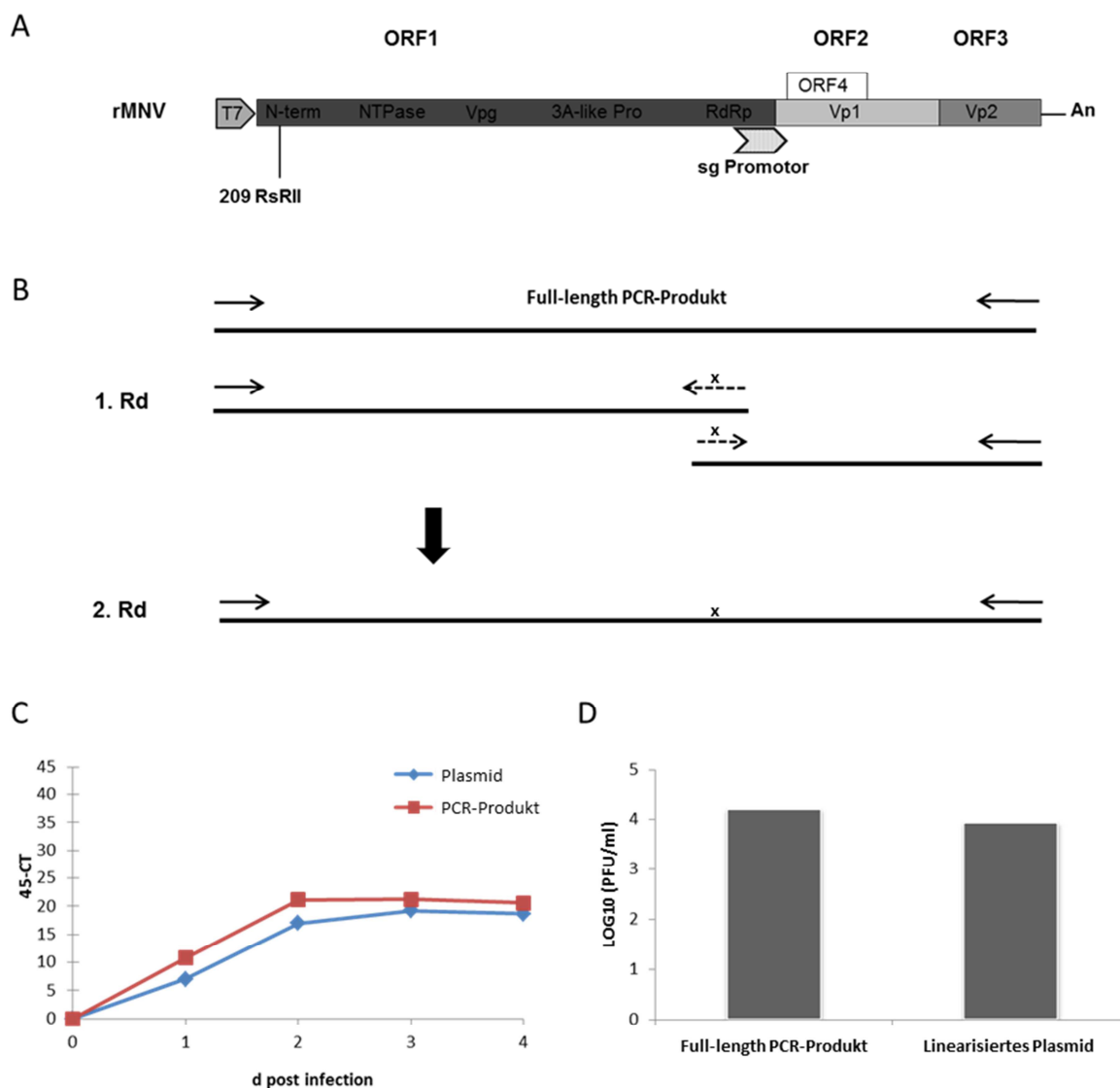


Abb. 4. 19: Optimierungsarbeiten am reversen Genetiksystm des MNV.

(A) rMNV Genom-Organisation: der linke dunkelgraue Kasten zeigt ORF1 mit den Strukturproteinen, der mittlere hellgraue Kasten stellt ORF2 mit dem Kapsidprotein VP1 dar, der rechte Kasten repräsentiert ORF3 mit dem kleinen Strukturprotein VP2. Der weiße Kasten zeigt die Position von ORF4. Der graue Pfeil vor ORF1 symbolisiert den T7-Promotor und der hellgraue Pfeil vor ORF2 zeigt die Lage des subgenomischen Promotors. Der polyA-Schwanz befindet sich hinter ORF3. An Position 209 nt ist der genetische Marker *RsrII* lokalisiert. (B) Generierung von Promotor-Mutanten via Extensions-PCR. Die schwarzen Pfeile zeigen die beiden äußeren Primer. Die gestrichelten Pfeile symbolisieren die Mutagenese-Primer in Runde 1. Die Fusion der mutagenisierten und überlappenden Fragmente wurde in einer 2. Runde durchgeführt. (C) Wachstumskurve des rMNV. Als Template für die *in-vitro* Transkription wurden ein full-length PCR-Produkt und aus einer Plasmidlinearisierung stammende DNA miteinander verglichen. RAW264.7 Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 mit Überständen von BHK-J Zellen 24 h nach der Elektroporation infiziert. Über vier Tage wurden Proben geerntet. Die RNA-Extraktion erfolgte via QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden). Danach fand die Analyse der RNA via Real-Time RT-PCR statt. (D) Vergleich verschiedener DNA-Templates bei der *in-vitro* Transkription. RAW264.7 Zellen wurden mit seriell verdünnten Überständen 24 h nach der Elektroporation infiziert. Für die Transfektion wurde erneut gecappte RNA verwendet, dessen DNA-Template entweder von einem full-length PCR-Produkt oder einem linearisierten Plasmid stammte.

4.4.2 Die Entwicklung erster Promotormutanten

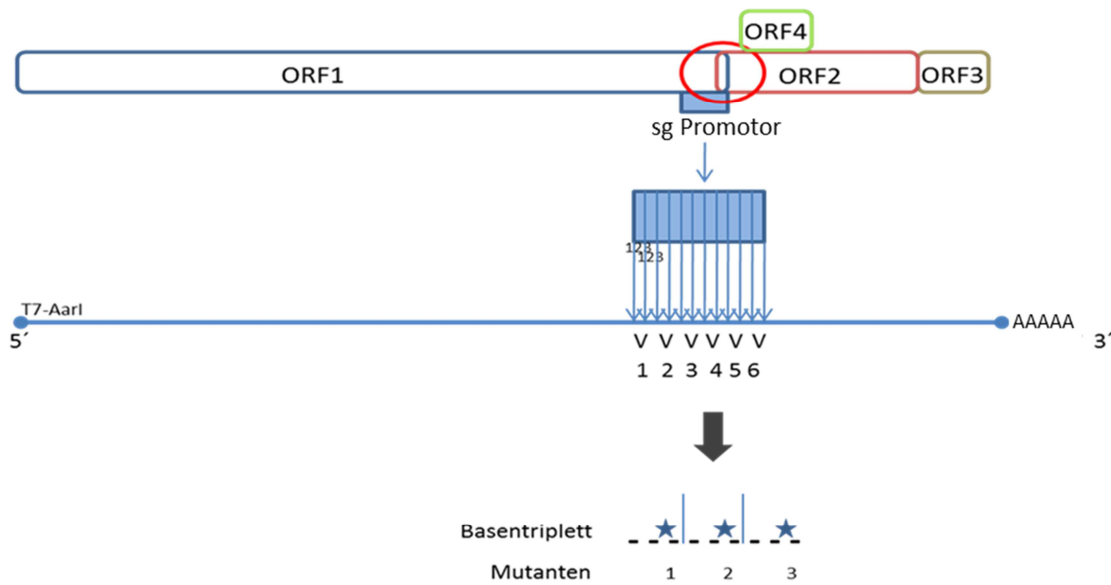
Zu Beginn dieser Mutationsanalyse sollte herausgefunden werden, wie viele und welche Art von Mutationen das murine Norovirus im Bereich des subgenomischen Promotors benötigt, um einen Verlust der Replikation zu erleiden. Zusätzlich sollte bestimmt werden, welchen Einfluss dabei die Art des Basenaustausches (Transversion oder Transition) auf das Viruswachstum ausübt.

Um diese allgemeine Fragestellung zu klären, wurden zunächst sechs Mutanten über Extensions-PCR generiert. Das Verfahren wurde detailliert im vorherigen Abschnitt beschrieben. Die Lage und Art der Mutationen sowie die Anzahl der Basenaustausche sind in Abbildung 4.20 A/B dargestellt. Der subgenomische Promotor besteht aus einer charakteristischen Stem-Loop Struktur und ist direkt vor ORF2 lokalisiert.

Unter Einhaltung des genetischen Codes wurde jeweils die dritte Base eines Triplets mutagenisiert, um einen Aminosäureaustausch zu vermeiden. Nach der *in-vitro* Transkription der aufgereinigten PCR-Produkte (3.5.1) erfolgte die Elektroporation der einzelnen Mutanten in BHK-J Zellen (3.1.2). Der Virustiter sollte 24 h später auf suszeptiblen RAW264.7 Zellen bestimmt werden. Dabei stellte sich zunächst heraus, dass keine einzige Mutante in der Lage war zu replizieren. Weder die mehrmalige Wiederholung der Experimente, noch eine Real-Time RT-PCR Analyse der Überstände erbrachte Hinweise auf Virusreplikation. Eine Sequenzierung der RNA vor der Transfektion bestätigte die jeweiligen Mutationen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass das murine Norovirus in dem Bereich zwischen der Überlappung von ORF1/2 und der Stem-Loop Struktur keine Mutation toleriert.

A



B

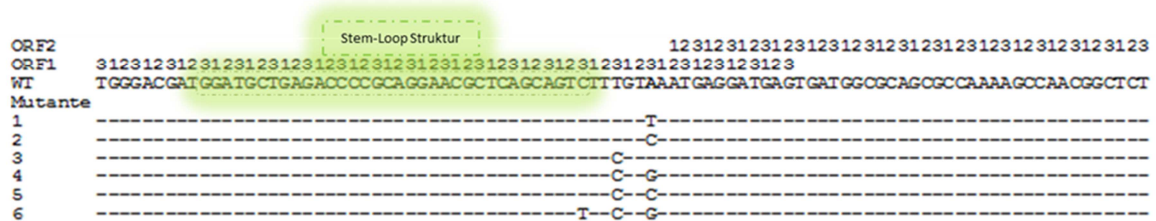


Abb. 4. 20: Entwicklung erster Promotormutanten.

(A) Darstellung der Mutagenese-Strategie und Lage des subgenomischen Promotors im MNV-Genom. Jedes Basentriplett des Promotorbereichs wurde an der dritten Position mutagenisiert, unter Einhaltung des genetischen Codes. (B) Generierung der ersten Promotormutanten. Designvorlage für die Erstellung der Mutagenese-Primer. Darstellung der Überlappung von ORF1 und ORF2 sowie der Stem-Loop Struktur des subgenomischen Promotors des MNV.

4.4.3 Mapping des subgenomischen Promotors

Als nächstes sollte eine Scanning-Mutagenese über die vollständige Stem-Loop Struktur des subgenomischen Promotors durchgeführt werden, um detaillierte Informationen über dessen Lage und Aktivität zu erhalten. Insgesamt wurden 13 Mutanten mit einer Punktmutation und 12 Mutanten mit einer Doppelmutation über Extensions-PCR generiert. Die beiden Teilschritte sind in den Abbildungen 4.21A und B dargestellt. Die entsprechenden Mutagenese-Primer sind in den Tabellen 2.5 und 2.6 aufgeführt. Jeweils die dritte Base eines Triplets wurde als Transition oder Transversion unter Einhaltung des genetischen Codes mutiert. Nach einer *in-vitro* Transkription wurden 3 µg RNA jeder Mutante in BHK-J Zellen elektroporiert (Abbildung 4.21C) und nach 24 h Inkubation der jeweilige Titer auf suszeptiblen RAW264.7 Zellen bestimmt (3.1.6).

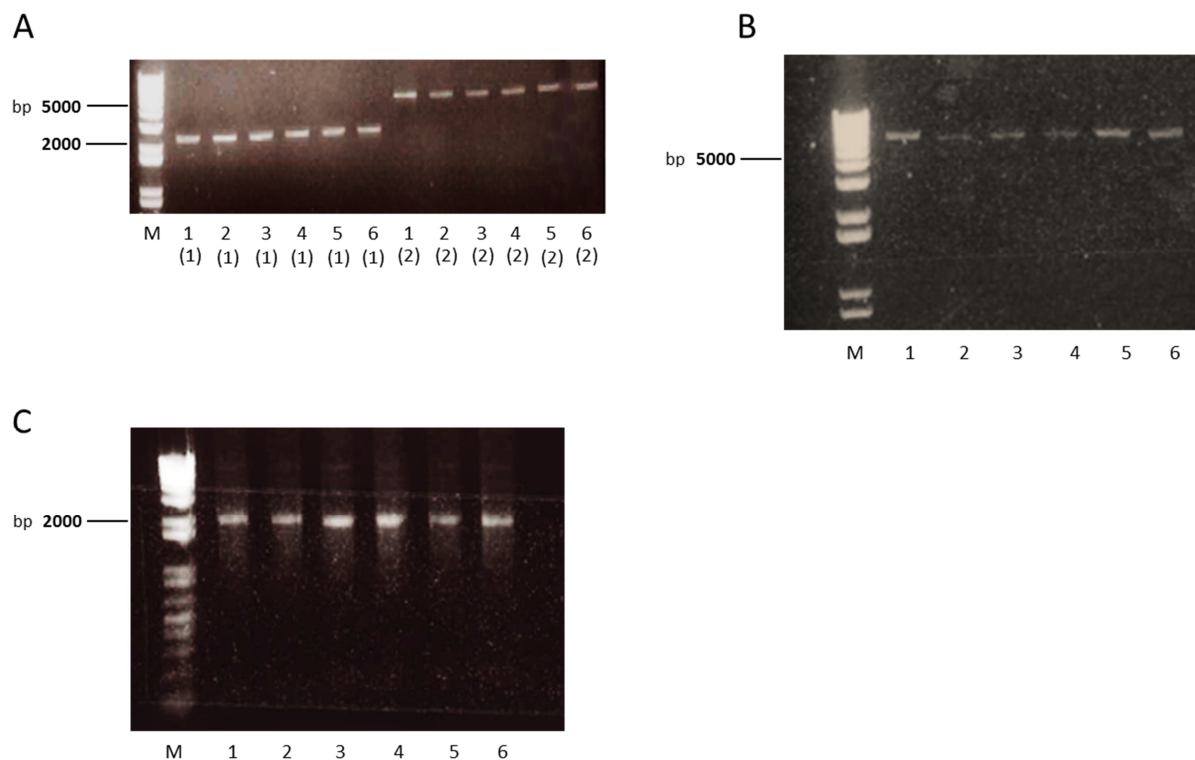


Abb. 4. 21: Generierung der subgenomischen Promotormutanten.

(A) Extensions-PCR Runde 1. Zwei äußere Primer SL1 und Aarl_T7 wurden standardmäßig in einer Phusion-PCR verwendet. Mit diesen beiden Oligonukleotiden wurden die jeweiligen Mutagenese-Primer kombiniert. Die Amplifikate wurden in einer Agarose-Gelaufreinigung von allen Verunreinigungen befreit und in einer zweiten PCR fusioniert. M: Molekulargewichtsmarker I. (B) Extensions-PCR Runde 2. Die aufgereinigten Amplifikate aus Runde 1 wurden durch die beiden äußeren Primern SL1 und T7_kurz fusioniert und in einem präparativen Agarosegel aufgereinigt. M: Molekulargewichtsmarker I. (C) *In-vitro* Transkription der mutagenisierten full-length PCR-Produkte. M: Molekulargewichtsmarker I. Auf die Verwendung eines spezifischen RNA-Markers wurde in diesem nichtdenaturierenden Agarosegel verzichtet (der verwendete DNA-Marker erlaubt keine Bestimmung der Molekülmasse).

Das Ergebnis der Transfektionen zeigte, dass nicht alle dieser im Stem-Loop mutierten Viren lebensfähig waren (Abbildung 4.22B). Ein Wachstum der Viren mit Einfachmutation wurde nur dann beobachtet, wenn die Mutation nicht in der unteren Ringstruktur des Stem-Loops oder kurz davor lag (Abbildung 4.22C). In diesem strukturempfindlichen Bereich des subgenomischen Promotors wurden Mutationen weder als Transition noch als Transversion toleriert. Replizierende Viren wiesen dagegen ein unterschiedlich starkes Wachstum mit Abweichungen zwischen 10 und 100 auf.

Viren mit Doppelmutationen im Stem-Loop unterlagen einem größeren Effekt. Nur drei der zwölf Mutanten besaßen noch die Fähigkeit zu replizieren. Zwei davon waren mit Mutationen im oberen Verbindungsstück des Stem-Loops, also noch vor den beiden Ringstrukturen, ausgestattet. Folglich bewirkten Zweifachmutationen im Inneren dieser Sekundärstruktur eine starke Destabilisation und konnten sogar den Verlust der Lebensfähigkeit hervorrufen. Die dritte replizierende Doppelmutante verfügte über zwei Basenaustausche kurz vor der Stem-Loop Struktur in 5'-Richtung, so dass dieser Bereich des subgenomischen Promotors wieder weniger sensitiv auf Mutationen zu reagieren schien.

Mehrmalige Wiederholungen dieser Transfektionen sowie eine Real-Time RT-PCR-Analyse der Überstände bestätigten dieses Ergebnis. Die jeweiligen Mutationen wurden zudem vor der Elektroporation durch Sequenzierung überprüft.

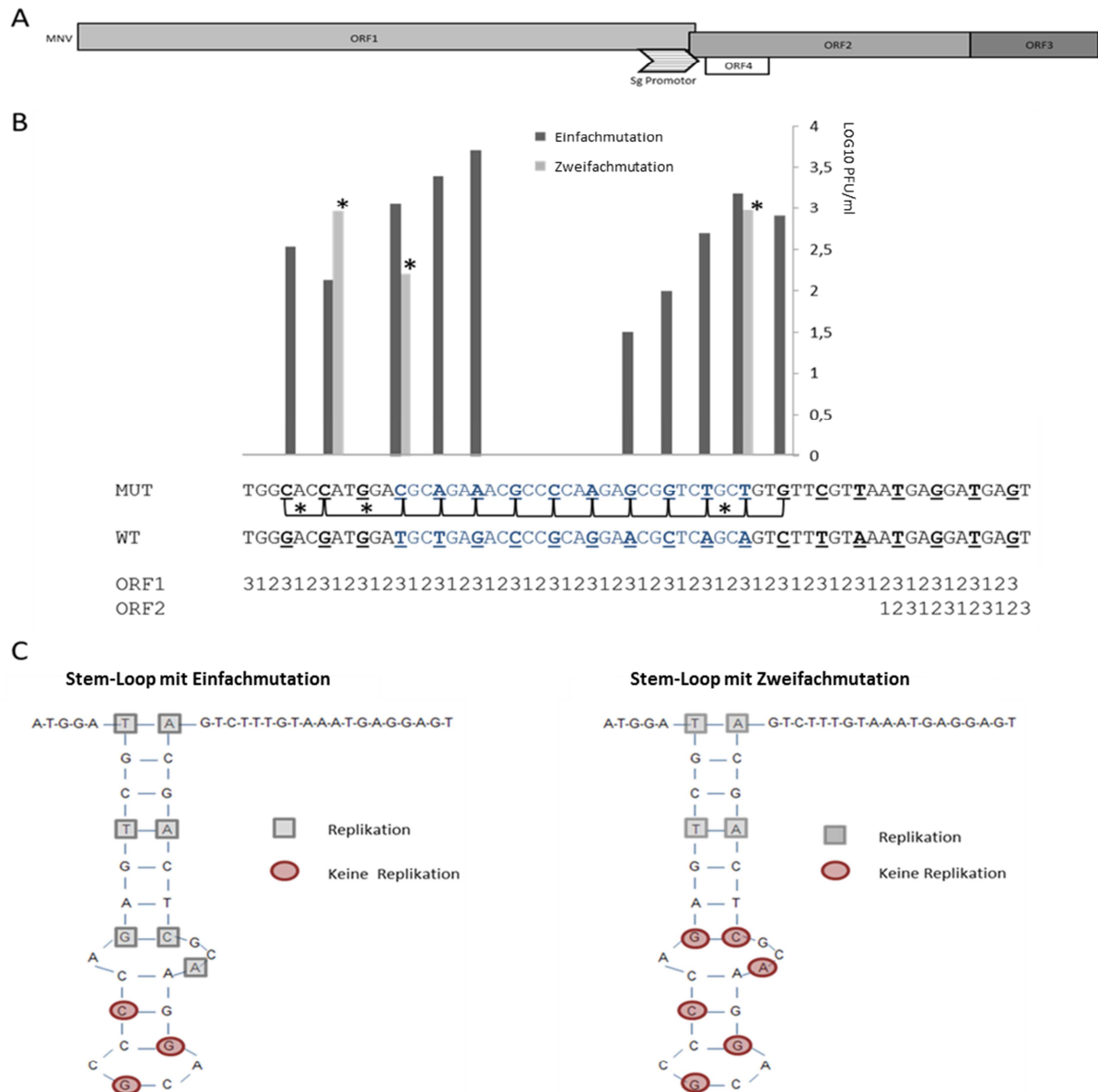


Abb. 4. 22: Charakterisierung des subgenomischen Promotors durch Einfach- und Zweifachmutationen.

(A) Schematische Darstellung der Lage des subgenomischen Promotors im MNV-Genom. (B) Vergleich der Replikationseffizienzen der Promotormutanten. Die Generierung erfolgte über Extensions-PCR und entsprechende Mutagenese-Primer. 3 µg RNA wurden jeweils in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und CO₂ wurden die Überstände auf RAW264.7 Zellen titriert und im Anschluss die Virusreplikation analysiert. Die unterstrichenen Nukleotide zeigen den jeweiligen Basenaustausch. Klammern mit Stern repräsentieren replizierende Zweifachmutanten. Klammern ohne Stern zeigen nichtreplizierende Zweifachmutanten. Blau unterlegte Nukleotide stellen die Position des Stem-Loop dar. (C) Zusammenfassung der Punkt- und Zweifachmutationen im Stem-Loop des subgenomischen Promotors. Vergleich der jeweiligen mutierten Nukleotide und deren Positionen im Stem-Loop.

Um den Einfluss dieser destabilisierenden Mutationen genauer zu untersuchen, wurden die drei nichtreplizierenden Viren mit letaler Einfachmutation als neue Varianten konstruiert. Zwei der drei Viren ließen sich an der jeweiligen Position des Basenaustausches weiter mutagenisieren, unter der Bedingung einen Aminosäure-Austausch zu vermeiden. Durch diese neuen Mutanten sollte nun geklärt werden, ob bestimmte Nukleotide der Ringstrukturen einen entscheidenden Einfluß auf die MNV-Replikation ausüben. Dabei sollte bestimmt werden, welche Basen sich vorteilhaft gegenüber stehen und was für eine Rolle die Ringgröße spielt.

Auch diese Mutanten wurden über Extensions-PCR (3.4.5) mit den entsprechenden Mutagense-Primern hergestellt (Tabelle 2.5 / 2.6) und 3 µg der *in-vitro* transkribierten RNA in BHK-J Zellen elektroporiert. Die Virus-Titer wurden 24 h später auf suszeptiblen RAW264.7 Zellen bestimmt.

Abbildung 4.23A und B zeigen die erhaltenen Ergebnisse. Im oberen Ring des Stem-Loops wirkte lediglich der Austausch von Cytosin zu Guanin letal für das Virus. Diese Transversion bildete ein fünftes Guanin in Folge, was scheinbar zu einer Destabilisation im Ring und zum Verlust der Lebensfähigkeit führte. Alle weiteren Basenaustausche an dieser Position übten weniger Beeinträchtigungen auf die Replikation aus, doch wurden deutlich geringere Titer für diese Mutanten als der des WT-MNV bestimmt. Somit erbrachte keine Mutation in der oberen Ringstruktur einen Vorteil für das Wachstum des MNV.

Das Verbindungsstück zur unteren Ringstruktur dagegen tolerierte absolut keine Art von Mutation. Weder eine Transition noch eine Transversion erlaubten an dieser Position Viruswachstum. Für die Replikation des MNV war ein „Gegenüberstehen“ der ursprünglichen Nukleotide G-C an dieser Position zwingend erforderlich. Dieser Bereich des Stem-Loops schien hochgradig empfindlich, sogar noch stärker als die zuvor analysierte Ringstruktur.

Zusätzlich zeigten die untersuchten Mutanten einen Unterschied in der Plaque-Morphologie. Promotormutanten bildeten deutlich kleinere und feinere Plaques als das WT-MNV (Abbildung 4.23C). Demzufolge nahmen Mutationen in diesem sensiblen Genomabschnitt des MNV auch Einfluss auf den gesamten Virus-Phänotyp.

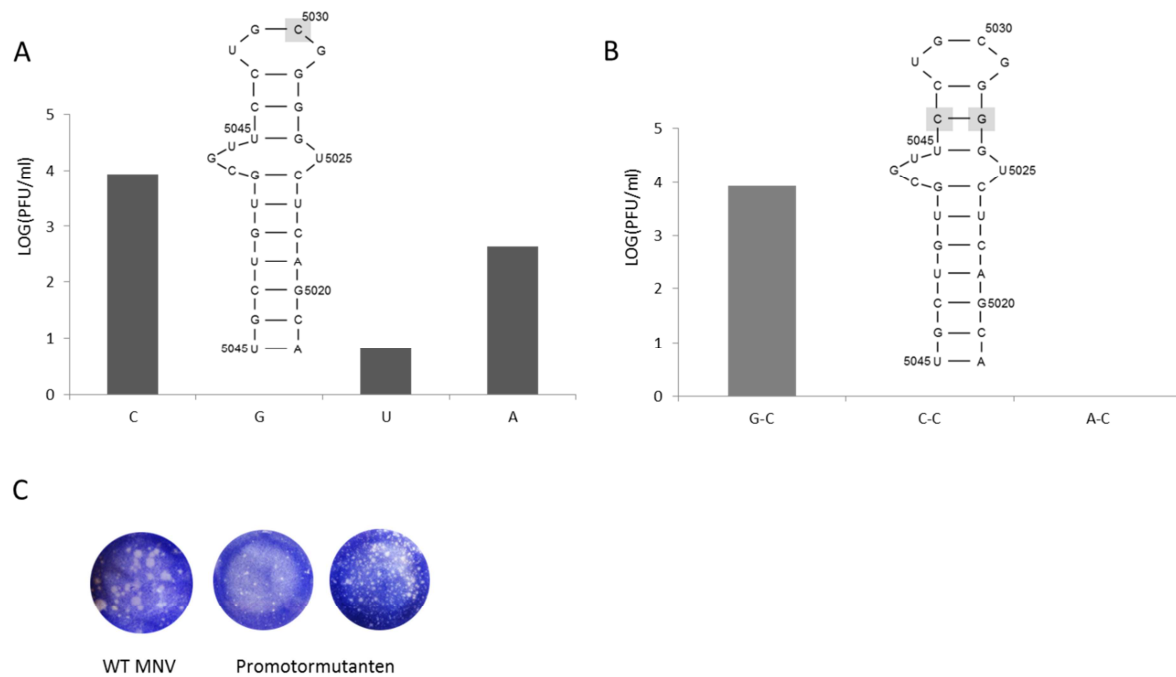


Abb. 4. 23: Wachstumsanalyse der nichtreplizierenden Stem-Loop Promotormutanten.

(A) Drei weitere Varianten der unteren Ringstruktur wurden durch Extensions-PCR und den entsprechenden Mutagenesprimern generiert und 3 µg der *in-vitro* transkribierten RNA in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Überstände auf RAW264.7 Zellen titriert. (B) Zwei zusätzliche Varianten für das Verbindungsstück zur unteren Ringstruktur wurden durch Extensions-PCR hergestellt. 3 µg *in-vitro* transkribierte RNA wurde in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 24 h Inkubation wurden die Überstände auf RAW264.7 Zellen titriert. (C) Plaque-Assay mit Kristallviolett-Färbung: subgenomische Promotor Mutanten bildeten kleinere Plaques als der Wildtyp.

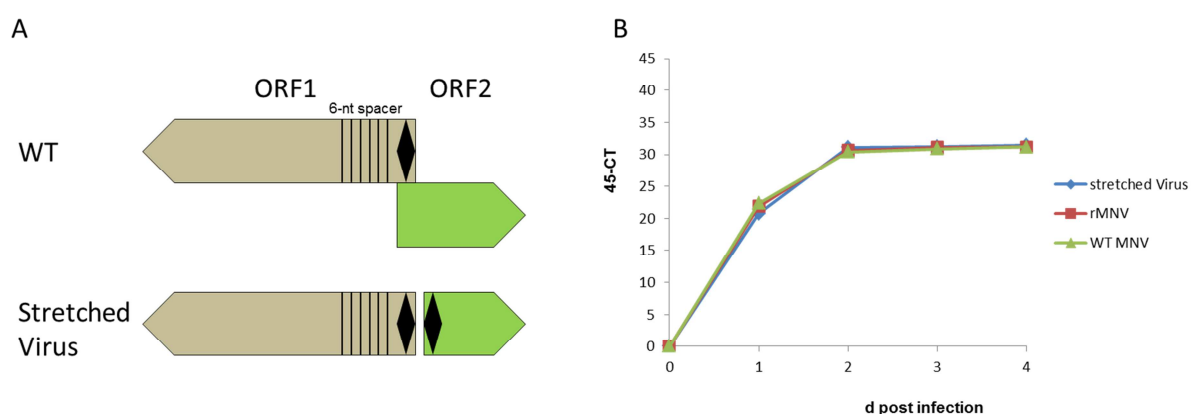
4.5 Das „auseinandergezogene“ Virus (stretched Virus)

Zu einer vollständigen Analyse des subgenomischen Promotorbereichs gehörte auch das Mutations-Scanning in 3'-Richtung des Virusgenoms. Einen begrenzenden Faktor stellte dabei die Überlappung von ORF1 und ORF2 dar. Deshalb wurde ein Virus mit einem „auseinandergezogenen“ ORF1 und ORF2 Bereich generiert. Abbildung 4.24A zeigt eine schematische Darstellung des sog. Virus 8. Über Extensions-PCR mit den entsprechenden Mutagenese-Primern (Tabelle 2.5 / 2.6) wurde dieses Virus 8 gegenüber dem Wildtyp um 17 Basen verlängert, *in-vitro* transkribiert und in BHK-J Zellen elektroporiert (3.1.2). Das Viruswachstum wurde auf suszeptiblen RAW264.7 Zellen bestimmt und zeigte keinen beachtlichen Unterschied zum Wildtyp, so dass die Trennung von ORF1 und ORF2 scheinbar keinen negativen Einfluß auf die Replikation des MNV hatte.

Durch Real-Time RT-PCR wurde eine Wachstumskinetik von WT-MNV, rMNV und dem „auseinandergezogenen“ Virus 8 erstellt. Hierzu wurden die Überstände von Elektroporationsreaktionen zunächst auf RAW264.7 Zellen titriert und dann jeweils Virusdosen einer MOI=1 erneut auf RAW264.7 Zellen

vergleichend infiziert. Das Viruswachstum wurde durch Real-Time RT-PCR verfolgt (3.4.12). Die Wachstumskurven dieser drei Viren sind in Abbildung 4.24B dargestellt. Durch das Auseinanderziehen von ORF1 und ORF2 konnte kein nachteiliger Effekt auf das Viruswachstum ermittelt werden. Auf dieser Basis wurde damit begonnen, MNV auch in diesem zunächst unzugänglichen Bereich des subgenomischen Promotors zu mutieren. Vier zusätzliche Mutanten wurden über Extensions-PCR mit den entsprechenden Mutagenese-Primern (Tabelle 2.5 und 2.6) amplifiziert. V8.1, V8.2, V8.3 und V8.4 trugen direkt am 3'-Ende von ORF1 eine Transition. Eine schematische Darstellung auf Nukleotid-Ebene ist in Abbildung 4.24C gezeigt. Jede dritte Base eines Tripletts wurde unter Einhaltung des genetischen Codes mutiert. Nach der *in-vitro* Transkription wurden jeweils 3 µg RNA in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 24 h wurden die Überstände auf RAW264.7 Zellen transferiert und titriert.

Abbildung 4.24C zeigt die relativen Replikationseffizienzen der Mutanten V8.1 bis V8.4. Dabei war zu beobachten, dass das Viruswachstum anstieg, je näher die Mutation an den Grenzbereich ORF1/ORF2 vorrückte. Die Mutante V8.1 besaß den Basenaustausch im ursprünglichen Startcodon ATG (T→C) von ORF2 und replizierte als einziges Virus nicht nach der Transfektion. Demnach tolerierten diese „auseinandergezogenen“ Viren Mutationen in Form einer Transition. Das erste ATG schien jedoch weiterhin eine grundlegende Rolle für das Viruswachstum zu spielen. Um einen Aminosäureaustausch zu vermeiden, konnten keine weiteren Virus-Varianten an dieser Stelle generiert werden.



(A) Schematische Darstellung von WT MNV und dem stretched Virus V8 mit Fokus auf den duplizierten Genomabschnitt.

Abbildung 4.24C zeigt die jeweiligen Replikationseffizienzen im Vergleich mit den weiteren Virus 8 Varianten. Bei Mutante V8_Ala wurde das vollständige ATG durch GCG ersetzt, was auf Aminosäureebene zu einem Austausch von Methionin zu Alanin führte. Die Transfektion dieser RNA ergab eine sehr gut replizierende Mutante. Im Vergleich zum unmutierten Virus 8 zeigte V8_Ala ein nur wenig geringeres Wachstum. V8_Ins und V8_Del bewirkten durch die Deletion bzw. Insertion von Thymin einen Frameshift vor dem zweiten „neuen“ ATG, falls dieser Bereich vom ersten ATG ausgehend translatiert wurde. Wäre das zweite ATG hingegen das Start-Codon für ORF2, müsste trotzdem eine Replikation stattfinden. Beide Mutanten replizierten jedoch nicht.

Durch diese Experimente konnte schließlich gezeigt werden, dass das zweite ATG keine essentielle Rolle für das „auseinandergezogene“ Virus 8 spielt. Das erste „ursprüngliche“ ATG fungierte weiterhin als Start-Codon für ORF2 und wurde durch den duplizierten, auseinandergezogenen Bereich nicht negativ beeinflusst.

Die Abbildungen 4.25A und B zeigen eine Übersicht des Promotor-Scannings und eine Zusammenfassung aller bisherigen Einfachmutanten, einschließlich der „auseinandergezogenen“ Viren V8.1 bis V8.4. Alle Promotormutanten wurden dabei systematisch angeordnet, wodurch die sensitiven Bereiche des subgenomischen Promotors hervortraten. Besonders der Stem-Loop mit dem konservierten 4 nt Element im unteren Ring (grün) zeigte am deutlichsten, wie wichtig die bestehende Struktur ist und dass jede noch so kleine Veränderung eine Beeinträchtigung des Viruswachstums hervorruft.

Hinter dem Stem-Loop in 3'-Richtung ist ein weiteres 5 nt großes konserviertes Element lokalisiert. Zwei durchgeführte Mutationen in diesem Bereich führten entweder zu einer verringerten oder zu gar keiner Replikation des MNV. Das Gleiche galt für den untersuchten 5'-Sequenzabschnitt des subgenomischen Promotors. Für diese Region wurde ebenfalls ein eingeschränktes Viruswachstum beobachtet, deshalb sollten nachfolgende Experimente weiteren Aufschluss dazu liefern.

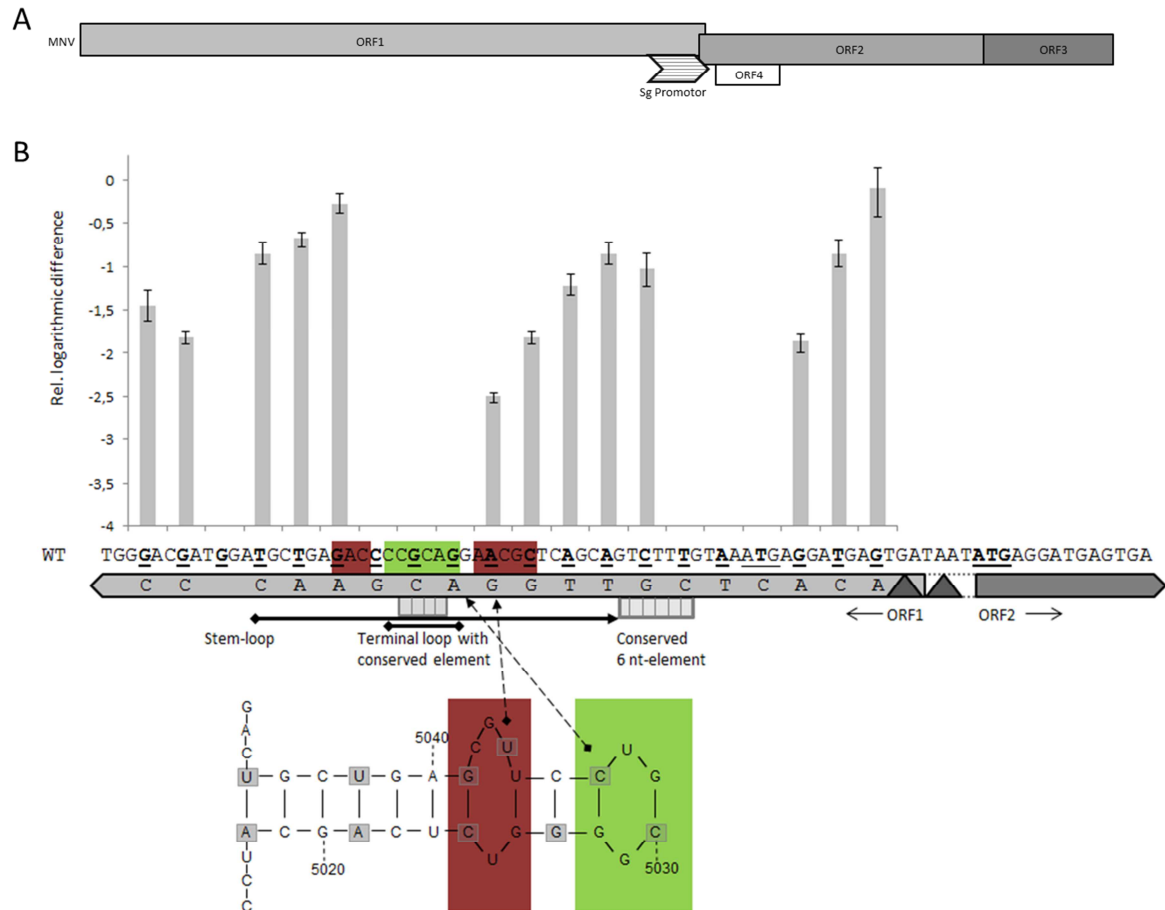


Abb. 4. 25: Zusammenfassung der bisher generierten subgenomischen Promotormutanten.

(A) Schematische Darstellung der Lage des Promotors im MNV-Genom. (B) Relative Replikationseffizienzen der Mutanten mit Fehlerindikatoren. Die unterstrichenen Nukleotide zeigen jede mutierte dritte Base eines Triplets an, darunter repräsentiert der hellgraue Kasten die ausgetauschten Nukleotide. ATG-Startcodons sind unterstrichen und im „auseinandergezogenen“ Kontext dargestellt. Des Weiteren ist der Stem-Loop und seine konservierten Elemente im unteren Bildabschnitt zu finden.

4.6 Charakterisierung der subgenomischen Promotormutanten durch den Northern Blot

Durch Northern Blot sollten Auswirkungen der Mutationen des subgenomischen Promotors auf die Transkription analysiert werden. Im Fokus der Experimente lag der Einfluss der Mutationen auf die subgenomische RNA. Zudem sollte herausgefunden werden, ob nichtreplizierende Promotormutanten trotzdem in der Lage sind, mRNA zu produzieren. Durch diese Methode konnte außerdem das Niveau der subgenomischen RNA mit dem der genomischen RNA direkt nach einer MNV-Infektion verglichen werden.

4.6.1 Etablierung der Northern Blot-Methodik

Zur Etablierung des Northern Blots wurden zunächst Vorarbeiten mit dem rekombinanten WT-MNV durchgeführt. Ein Amplifikat der beiden äußeren Primern T7-Aarl-Fwd und SL1 wurde aufgereinigt, *in-vitro* transkribiert und in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und CO₂ wurde der Überstand auf suszeptiblen RAW264.7 Zellen titriert. Nach Bestimmung des Virustiters wurden RAW264.7 Zellen mit einer MOI von 1 und 0,1 infiziert. Die Inkubationszeit betrug 1,5 Tage. Danach wurden die Zellen lysiert und die enthaltene RNA durch das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert (3.5.4). Die Eluate wurden im Photometer vermessen, um genau 250 ng RNA pro Spur in einem 1,5 %-igen Agarose-Formaldehyd/MOPS-Gel einzusetzen. Der Northern Blot wurde wie in Kapitel 3.5.9 beschrieben durchgeführt. Die dafür benötigten Digoxigenin (DIG)-markierten Hybridisierungssonden wurden für den Bereich der subgenomischen RNA amplifiziert (3.5.9.1). Sonde 1 (306 nt) wurde durch die Primer F5972 und R6278 produziert und mit DIG-11-dUTP durch das DIG Northern Starter Kit (Roche, Mannheim) markiert. Die zweite Sonde (679 nt) wurde durch die Primer F5599 und R6278 hergestellt und ebenfalls mit DIG-11-dUTP markiert. Aufgrund der Markierung der Sonden entstand eine spezifische Größenverschiebung, die je nach Nukleotidanzahl variiert (Abbildung 4.26A). Durch das Auftragen der Hybridisierungssonden im Agarosegel konnte die Vollständigkeit der Reaktion überprüft werden.

Abbildung 4.26B zeigt das Ergebnis des ersten gelungenen Northern Blots. Durch Sonde 1 wurden zwei deutliche Banden für die Proben WT-MNV MOI 1 und 0,1 detektiert. Die Größe entsprach mit ca. 2400 nt der subgenomischen RNA. Für MOI 1 war eine allgemein stärkere Intensität der Banden zu verzeichnen. Sonde 2 zeigte äußerst ausgeprägte Signale, so dass eine klare Bande nur schwer zu erkennen war. Im oberen Abschnitt des Northern Blots befand sich zusätzlich eine weitere Bande, welche der genomischen RNA des MNV entsprechen könnte. In diesem Testlauf wurden jedoch weder der RNA Molecular Weight Marker I (Roche, Mannheim) noch die genomische RNA sauber aufgetrennt, so dass eine genauere Definition an dieser Stelle nicht möglich ist.

Als nächstes sollte die Northern Blot-Technik auf die zu untersuchenden, subgenomischen Promotor-mutanten adaptiert werden. Vier verschiedene Mutanten wurden zu diesem Zweck ausgewählt. Zwei nichtreplizierende Mutanten mit einem Basenaustausch im unteren Ring des Stem-Loops bzw. im Verbindungsstück dazu (M7; M6), eine stark replizierende Mutante (M5) und eine schwach replizierende Mutante (M9). RAW264.7 Zellen wurden mit Elektroporationsüberständen dieser Mutanten infiziert. Durch einen vorher bestimmten Titer der Überstände konnte mit einer MOI von 0,1 gearbeitet werden. Für nichtreplizierende Mutanten wurden 0,5 ml des Elektroporations-überstands eingesetzt. Nach 1,5 Tagen Inkubation bei 37 °C und CO₂ wurden die Zellen lysiert und die RNA mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Die Eluate wurden anschließend mit dem Photometer vermessen, so dass für das 1,5 %-ige Agarose-Formaldehyd/MOPS-Gel die jeweils exakt 250 ng RNA pro Spur eingesetzt werden konnte. Das RNA-Gel sowie der Northern Blot wurden wie in Kapitel 3.5.8 und 3.5.9 beschrieben durchgeführt.

Abbildung 4.26C zeigt den entwickelten Northern Blot der Promotormutanten. RNA wurde für die Positivkontrolle des Wildtyps MOI 0,1, für M5 und M9 detektiert. Keine Signale wurden für die nichtreplizierenden Mutanten M6 und M7 sowie für die Mock-Kontrolle erhalten. Auf diesem Blot ist außerdem die genomische RNA der replizierenden Mutanten durch eine charakteristische Bande bei ca. 7400 nt dargestellt. Alle RNA-Proben wurden mit Sonde 1 und 2 hybridisiert, um optimale Versuchsbedingungen zu bestimmen.

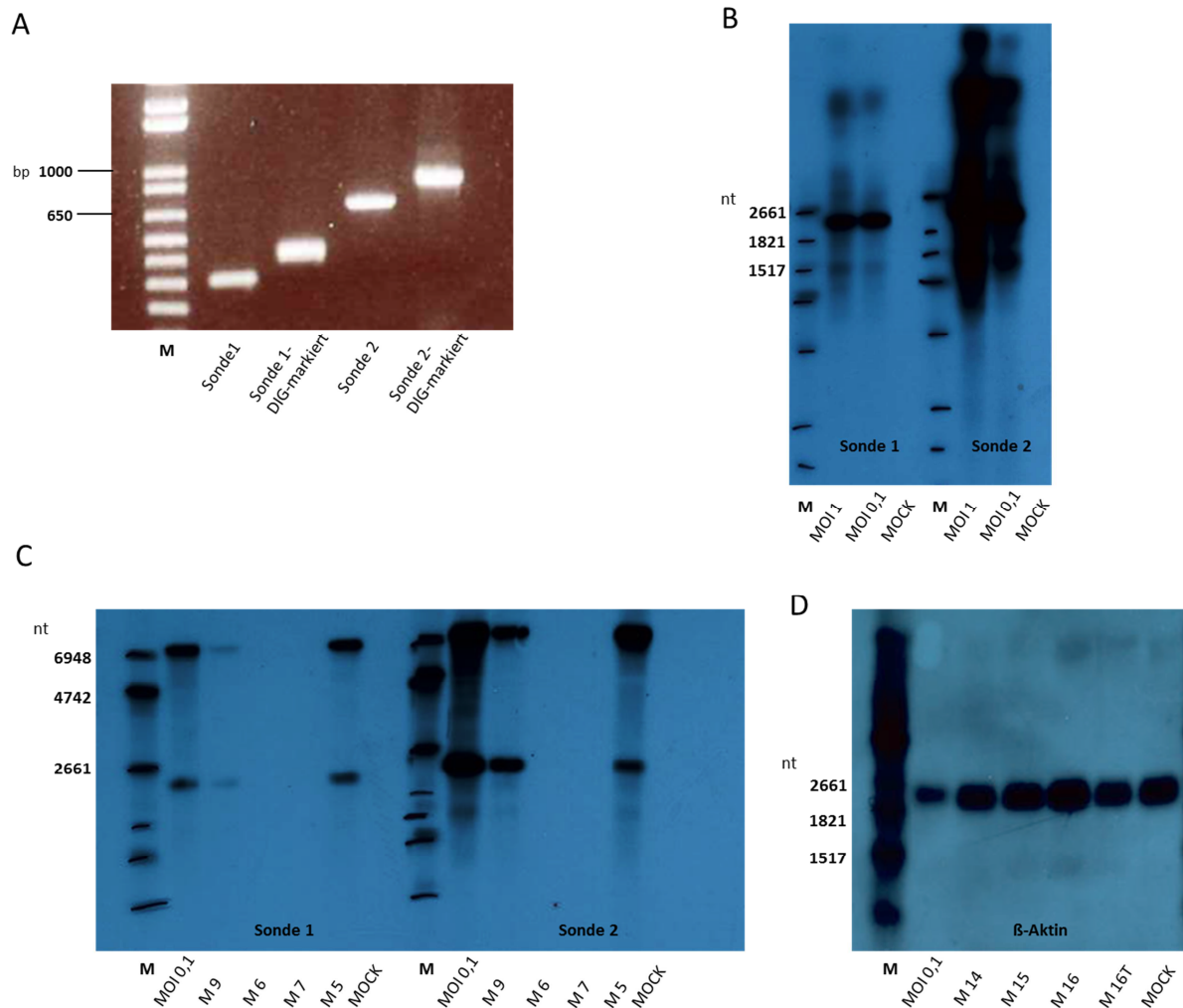


Abb. 4. 26: Etablierung des Northern Blots zur Charakterisierung der subgenomischen Promotormutanten.

(A) Herstellung der DIG-markierten Hybridisierungssonden. Für Sonde 1 wurden die Primer F5972 und R6278 in einer PCR mittels DIG Northern Starter Kit (Roche, Mannheim) eingesetzt. Für Sonde 2 wurde das gleiche Verfahren mit den Primern F5599 und R6278 angewendet. Durch die DIG-Markierung entstand eine spezifische Größenverschiebung. (B) Erster Testlauf der beiden Sonden im Northern Blot. Als Probenmaterial wurde extrahierte Wildtyp-RNA von infizierten RAW264.7 Zellen verwendet. Die Zellen wurden 1,5 Tage zuvor mit einer MOI von 1 und 0,1 infiziert. Als RNA-Marker wurde der RNA Molecular Weight Marker I, DIG-markiert, (Roche, Mannheim) verwendet. (C) Erster Probelauf der Promotormutanten mit beiden Sonden. MOI 0,1 repräsentiert WT-MNV als Positivkontrolle und M5 – M9 als die zu analysierenden Promotormutanten. RAW264.7 Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit EP-Überständen infiziert und 1,5 Tage inkubiert. Die RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) extrahiert. Von jeder Probe wurden 250 ng RNA pro Spur im Agarose-Formaldehyd/MOPS-Gel eingesetzt. (D) Testlauf der β -Aktin-Beladungskontrolle. RAW264.7 Zellen wurden mit jeweils 0,5 ml EP-Überstand der Mutanten M14-M16T infiziert. Nach 1,5 Tagen erfolgte die Zellyse mit RNA-Extraktion. Die Hybridisierung wurde mit der DIG-markierten RNA Sonde β -Aktin (Roche, Mannheim) unter Verwendung der Konzentration von 50 ng/ml durchgeführt.

Dieser erste Testlauf der subgenomischen Promotormutanten zeigte für beide replizierenden Mutanten spezifische Banden auf Höhe der subgenomischen (ca. 2400 nt) und genomischen (ca. 7400 nt) RNA. Die schwach replizierende Mutante M9 zeigte im Vergleich zu M5, einer gut replizierenden Mutante, einen klaren Unterschied in der Bandenintensität. Beide Promotormutanten wurden durch Sonde 2 sehr gut nachgewiesen. Für alle weiteren Northern Blot-Arbeiten wurde deshalb vorwiegend diese Sonde eingesetzt.

Um zudem eine genaue Aussage über die Intensitäten der einzelnen Banden unterschiedlicher Promotormutanten treffen zu können, wurde eine Ladungskontrolle mittels DIG-markierter RNA-Sonde β -Aktin (Roche, Mannheim) etabliert. Der Northern Blot in Abbildung 4.26D zeigt für jede untersuchte Probe eine deutliche Bande bei 1900 nt für β -Aktin. Die Intensitäten der Promotormutanten und der Mock-Kontrolle waren nahezu identisch.

4.6.2 Analyse der subgenomischen Promotormutanten

Als nächstes wurden alle Promotormutanten mit einer Punktmutation durch den Northern Blot charakterisiert. Suszeptible RAW264.7 Zellen wurden dazu mit den entsprechenden EP-Überständen infiziert. Bei replizierenden Mutanten wurde eine MOI von 0,1 verwendet, anderenfalls wurden 0,5 ml des EP-Überstands eingesetzt. Nach 1,5 Tagen Inkubation erfolgte die Zelllyse und RNA-Extraktion durch das RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Durch die photometrische Vermessung der Eluate wurde die einzusetzende RNA-Konzentration von jeweils 250 ng pro Spur bestimmt (3.5.3). Für jedes 1,5 %-ige Agarose-Formaldehyd/MOPS-Gel wurde die RNA von jeweils fünf Mutanten im Doppelansatz aufgetragen. Nach dem Transfer der RNA wurde die Nylon-Membran (Roche, Mannheim) für die unterschiedlichen Hybridisierungsvorgänge (genspezifische Sonde 2; β -Aktin Sonde) geteilt.

Das Ergebnis der Analyse der subgenomischen Promotormutanten durch den Northern Blot ist in Abbildung 4.27B dargestellt. Alle replizierenden Mutanten wiesen die beiden charakteristischen Banden der genomischen (7400 nt) und subgenomischen (2400 nt) RNA auf. Die subgenomische RNA verhielt sich dabei proportional zur genomischen RNA.

Alle nichtreplizierenden Mutanten produzierten auch keine genomische- bzw. subgenomische RNA. Somit bestätigte dieses Resultat die relativen Replikationseffizienzen der vorherigen Transfektionsversuche. Alle untersuchten Promotormutanten sind mit der jeweiligen Position des Basenaustausches und den entsprechenden Replikationseffizienzen für einen direkten Vergleich in Abbildung 4.27A dargestellt.

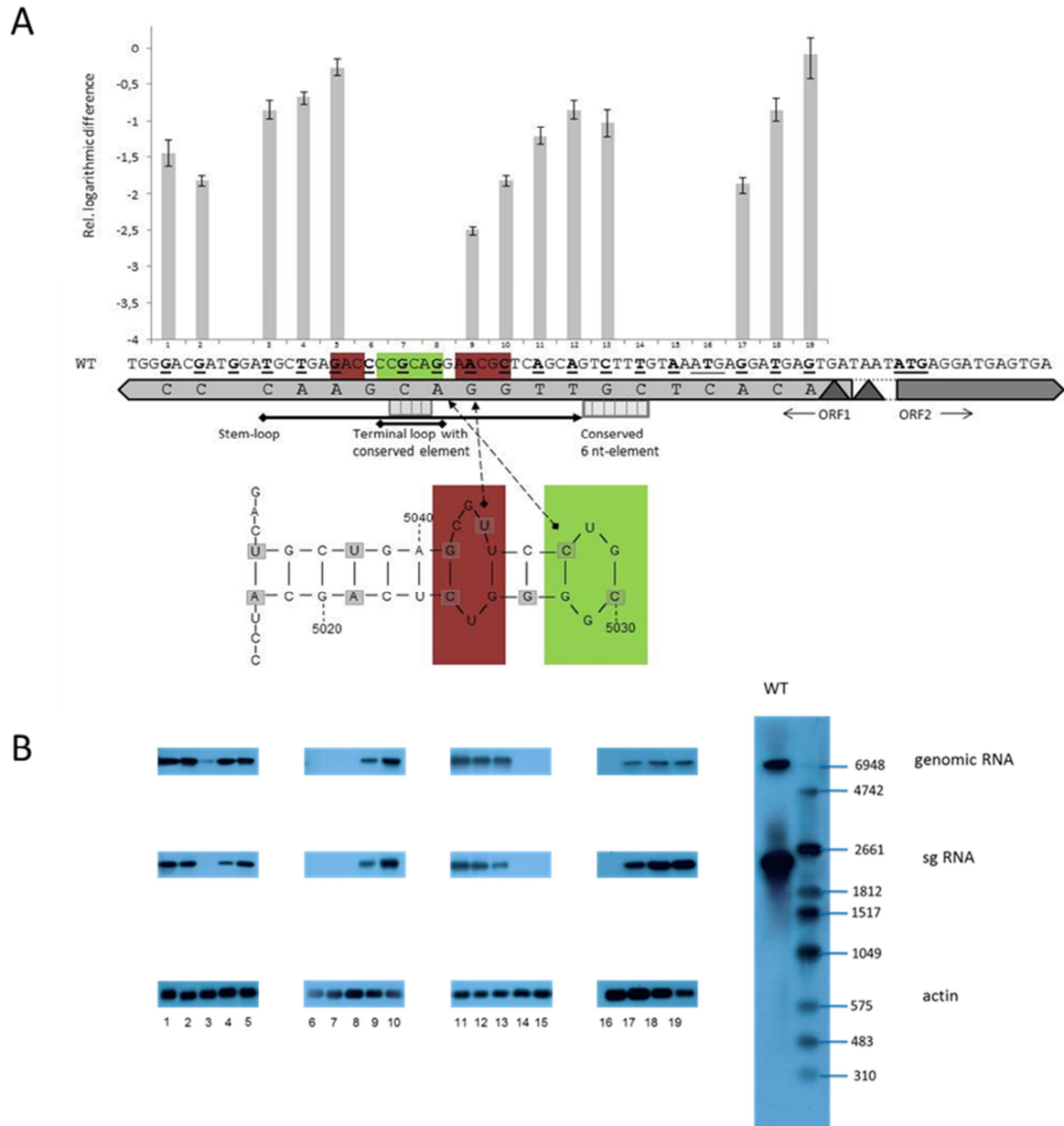


Abb. 4. 27: Charakterisierung der subgenomischen Promotormutanten via Northern Blot.

(A) Schematische Darstellung aller Mutanten mit Position des Basenaustausches, Lage im Genom und den entsprechenden Replikationseffizienzen. (B) Northern Blot-Analyse der untersuchten subgenomischen Promotormutanten. Auf der rechten Seite befinden sich der DIG-markierte RNA-Marker (Roche, Mannheim) sowie die charakteristischen Banden der genomischen und subgenomischen RNA des WT-MNV. Daneben sind die durch den Northern Blot detektierten Signale der analysierten Promotormutanten mit β -Aktin Kontrolle gezeigt.

4.7 Western Blot-Analyse der Promotormutanten

Die subgenomischen Promotormutanten sollten zusätzlich durch den Western Blot charakterisiert werden. Dafür wurden zwei Antikörper von der Firma Eurogentec (Köln) synthetisiert. Ein Antikörper war gegen das große Kapsidprotein VP1 gerichtet und ein weiterer gegen die RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp). Durch die Anwendung des Western Blots sollte herausgefunden werden, ob nichtreplizierende Viren, die keine subgenomische RNA produzieren, vielleicht trotzdem in der Lage sind, zumindest die Nichtstrukturproteine zu exprimieren.

Um den Western Blot zu etablieren, wurden mit dem Wildtyp-MNV infizierte RAW264.7 Zellen (MOI 1 und 0,1) für 1,5 Tage bei 37 °C unter CO₂ inkubiert. Die anschließende Zelllyse erfolgte in 1x Laemmli-Puffer. Vor der Beladung eines 12 %-igen SDS Polyacrylamid-Gels wurden die Proben für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Durchführung des Western Blots wurde detailliert in Kapitel 3.6 beschrieben. Abbildung 4.28A zeigt den Western Blot für beide Antikörper. Die optimale Antikörper-Konzentration wurde jeweils mit 1 : 5000 bestimmt. Der Kapsid-Antikörper zeigte unter Verwendung des Chemilumineszenz Kits SuperSignal® West Femto (Thermo Scientific, Darmstadt) eine charakteristische Bande bei 59 kDa. Der Polymerase-Antikörper detektierte bei 57,5 kDa eine typische Bande mittels SuperSignal® West Pico (Thermo Scientific, Darmstadt). Durch das deutlich stärkere Substrat entstanden jedoch im Hintergrund des Western Blots unspezifische Nebenbanden.

Nachdem die allgemeinen Reaktionsbedingungen für einen spezifischen Western Blot für beide Antikörper bestimmt worden waren, konnte mit der Adaptierung des Verfahrens auf die subgenomischen Promotormutanten begonnen werden. Getestet wurden erneut zwei nicht-replizierende Mutanten (M6 und M7), eine sehr gut replizierende Mutante (M5) sowie eine weniger gut replizierende Mutante (M9). Für die Etablierung des Western Blots wurden EP-Überstände entweder bei vorhandenem Titer mit einer MOI von 0,1 auf RAW264.7 Zellen transferiert oder 0,5 ml unverdünnt eingesetzt. Nach 1,5 Tagen Inkubation bei 37 °C und CO₂ erfolgte die Zelllyse in 1x Laemmli-Puffer. Das weitere Vorgehen ist in Kapitel 3.6 detailliert beschrieben.

In Abbildung 4.28B ist der Western Blot der Promotormutanten dargestellt. Nur bei den replizierenden Viren M9 und M5 konnten Struktur- und Nichtstrukturproteine (VP1/RdRp) durch charakteristische Banden nachgewiesen werden. Nichtreplizierende Mutanten zeigten auch keine Proteine im Western Blot.

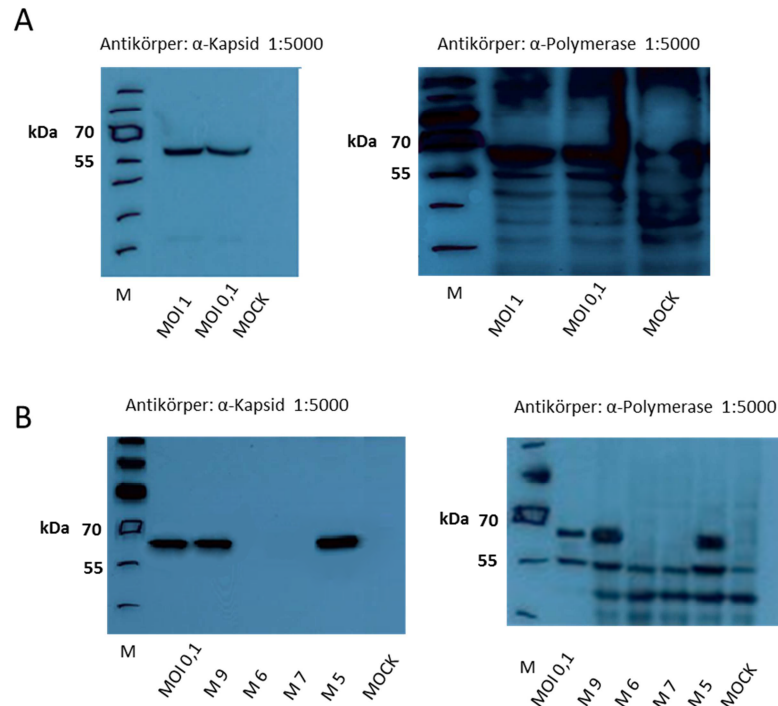


Abb. 4. 28: Etablierung des Western Blots zur Charakterisierung der subgenomischen Promotormutanten.

(A) Testlauf des Western Blots für WT-MNV. RAW264.7 Zellen wurden mit einer MOI von 1 und 0,1 infiziert und nach 1,5 Tagen Inkubation mittels 1x Laemmli-Puffer lysiert. Beide Antikörper wurden 1:5000 eingesetzt. Die Entwicklung des Blots erfolgte für den Kapsid-Antikörper mit dem Substrat SuperSignal® West Pico und für den Polymerase-Antikörper mit SuperSignal® West Femto. Als Marker diente der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Darmstadt). (B) Charakterisierung der Promotormutanten. Untersucht wurden zwei nichtreplizierende Mutanten (M6 und M7), eine sehr gut replizierende Mutante (M5) und eine weniger gut replizierende Mutante (M9). RAW264.7 Zellen wurden bei vorhandenem Titer mit einer MOI von 0,1, andernfalls mit 0,5 ml unverd. EP-Überstand infiziert. Nach 1,5 Tagen Inkubation erfolgte mittels 1x Laemmli-Puffer die Zelllyse. Beide Antikörper wurden 1:5000 eingesetzt. Als Marker diente erneut der PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Darmstadt).

Als nächstes wurde überprüft, ob nichtreplizierende Promotormutanten 24 h nach der Elektroporation überhaupt eines der beiden Proteine exprimieren. Mutationen des Promotors beeinflussen vielleicht lediglich die subgenomische RNA, so dass infolgedessen kein Kapsid-Protein synthetisiert werden kann. In diesem Fall wäre die RdRp, als Nichtstrukturprotein eventuell nachweisbar.

Um den Zusammenhang genauer zu analysieren, wurden BHK-J Zellen mit 3 μ g RNA der jeweiligen Mutanten elektroporiert und 24 h später in 1x Laemmli-Puffer lysiert. Im Vergleich zu den vorherigen Western Blot-Analysen wurden an dieser Stelle die Elektroporationsüberstände nicht auf susceptible RAW264.7 Zellen transferiert.

Die Untersuchung der BHK-J Zelllysate mittels RdRp-Antikörper zeigte trotz verschiedener Versuche, die Sensitivität gegenüber der Detektion der RdRp zu steigern, weder für den Wildtyp noch für Promotormutanten ein Signal. Grund dafür war wahrscheinlich ein zu niedriger Titer der Proben nach der Elektroporation. Die Viren durchliefen durch die fehlende Reinfektion nur einen einzelnen

Replikationszyklus in BHK-J Zellen, so dass ein Nachweis der viralen Proteine 24 h später nicht möglich sein könnte. Der anschließend auf RAW264.7 Zellen erreichte Titer betrug höchstens 1×10^4 PFU/ml. Die Charakterisierung der nichtreplizierenden Promotormutanten durch Western Blot wurde wegen der zu geringen Proteinkonzentrationen für diese Fragestellung nicht weitergeführt.

4.8 Ausgang der subgenomischen Promotorstudie

Um den vollständigen subgenomischen Promotorbereich zu analysieren, wurden Mutationen im 5'-Bereich der vor dem Promotor liegenden Sequenz durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden neun neue Mutanten in 5'-Richtung generiert und als M-1 bis M-9 bezeichnet. Jede dritte Base eines Triplets wurde unter Einhaltung des genetischen Codes mutiert. Die Amplifikation erfolgte über Extensions-PCR mit den entsprechenden Mutagenese-Primern (Tabelle 2.7 / 2.8) und ist mit dem in Kapitel 4.4.2 beschriebenen Vorgehen identisch. Es folgte eine *in-vitro* Transkription der PCR-Produkte sowie die Elektroporation von 3 µg RNA in BHK-J Zellen. Nach 24 h wurde der Überstand auf susceptible RAW264.7 Zellen transferiert, wodurch das Replikationsniveau der jeweiligen Mutanten bestimmt werden sollte.

Das Ergebnis ist in der zusammenfassenden Abbildung 4.30 der subgenomischen Promotorstudie dargestellt. Keine dieser neuen Mutanten war in der Lage zu replizieren. Weder die Sequenzierung der RNA vor der Elektroporation, noch die Analyse einer Wachstumskurve via Real-Time RT-PCR, erbrachten Hinweise auf Replikation.

Deshalb wurde im nächsten Arbeitsschritt der Promotorscanning-Bereich in 5'-Richtung ausgeweitet. Von nun an wurde nur noch jedes 10. Basentriplett an der dritten Position mutagenisiert, um auf diese Weise schneller einen größeren Sequenzabschnitt systematisch zu analysieren. Die letzte generierte Mutante in 5'-Richtung wurde als M-24 bezeichnet. Das Resultat war jedoch das Gleiche wie zuvor. Keine einzige Mutante replizierte.

Eine Klonierung dieser 5'- Promotormutanten in das Vektorsystem pSMART LCKan (Lucigen, Middleton) sollte als abschließender Versuch dienen, lebensfähige Mutanten in 5'-Richtung des Promotors zu charakterisieren. Durch Klonierung konnte vor der *in-vitro* Transkription eine verlässliche Sequenzanalyse der Matrizen-DNA durchgeführt werden, um möglicherweise unbemerkt aufgetretene Neumutationen auszuschließen (Abbildung 4.29 A/B).

Alle 5'-Screening Mutanten wurden über Extensions-PCR mit den entsprechenden Mutagenese-Primern und der darauffolgenden Klonierung der Produkte über die einmaligen Schnittstellen *NdeI* und *Sall* in den prMNV Vektor produziert (Abbildung 4.29C). Die insgesamt 24 Konstrukte wurden mittels *NotI* linearisiert und anschließend *in-vitro* transkribiert. Die Transkripte wurden in einem nichtdenaturierenden Agarosegel auf ihre Reinheit überprüft und in BHK-J Zellen elektroporiert (3.1.2). Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und CO₂ wurde der Überstand der Elektroporationsreaktionen auf susceptible RAW264.7 Zellen transferiert und titriert (3.1.6).

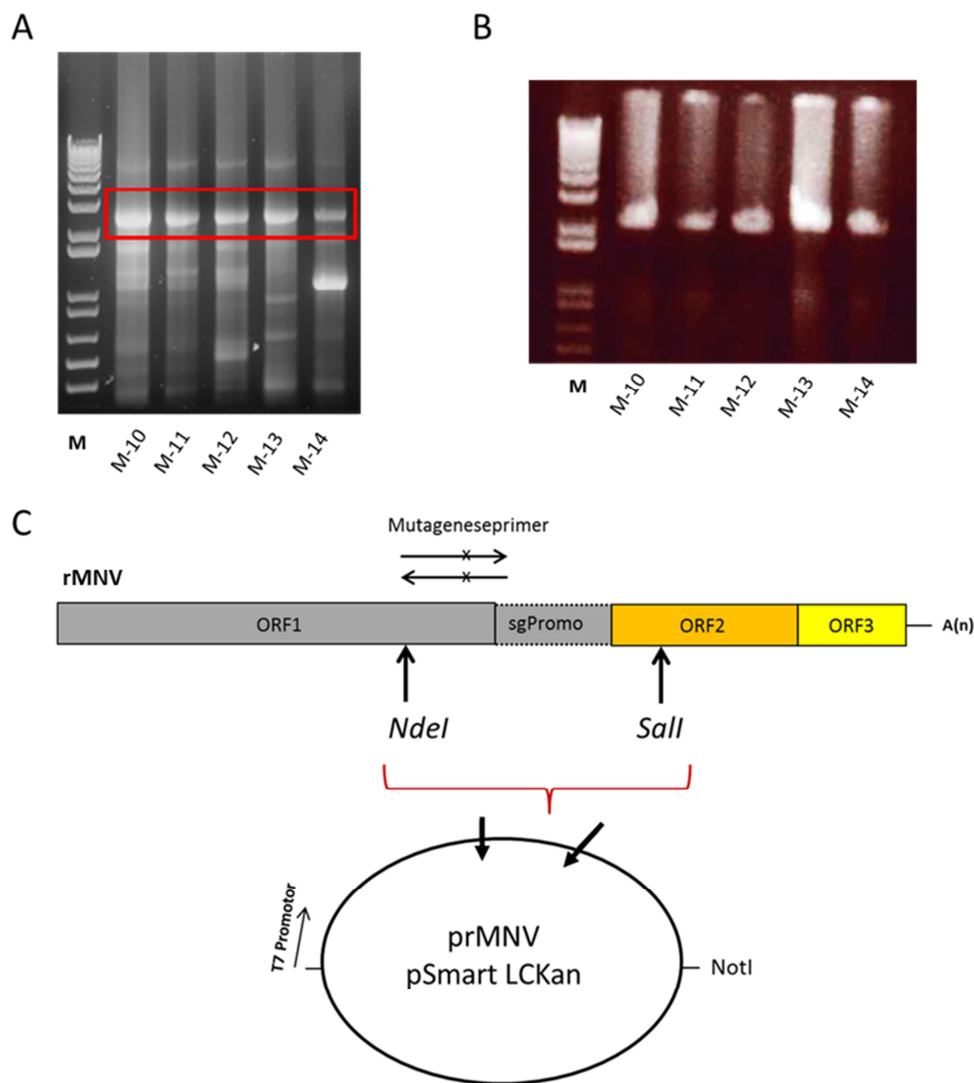


Abb. 4. 29: Analyse des 5'-terminierenden Bereichs des subgenomischen Promotors.

(A) Agarosegel zur Überprüfung der RNA nach der *in-vitro* Transkription. Die RNA wurde direkt aus Extensions-PCR Produkten generiert. Mutanten M-10 bis M-14 wurden aufgetragen. Der rote Kasten zeigt die vollständigen Transkripte. M: Molekulargewichtsmarker I. Auf die Verwendung eines spezifischen RNA-Markers wurde verzichtet. Der verwendete DNA-Marker erlaubt keine Bestimmung der Molekülmasse. (B) Agarosegel zur Überprüfung der RNA nach der *in-vitro* Transkription. Die RNA der Mutanten wurde über *NotI*- linearisierte Plasmide produziert. M: Molekulargewichtsmarker I; keine Bestimmung der Molekülmasse möglich. (C) Klonierungsstrategie der 5'- Promotormutanten. *NdeI* und *Sall* dienten als einmalige Schnittstellen im MNV-Genom. Die Pfeile über den Balken symbolisieren Mutagenese-Primer mit einem Basenaustausch. T7-Promotor und *NotI* repräsentieren 5' und 3'-Termini des MNV full-length Konstrukts.

Es wurden jedoch weiterhin keine replizierenden Mutanten für diesen Genomabschnitt identifiziert. Der analysierte 5'-Bereich vor dem subgenomischen Promotor ist demnach hochsensitiv und toleriert keine Mutationen. Ein Grund dafür könnte sein, dass essentielle Elemente des Replikationskomplexes in dieser Region lokalisiert sind, z. B. die RNA-abhängige RNA-Polymerase. Eine Beteiligung dieses entfernt gelegenen Abschnitts am Promotor wurde nicht vermutet.

Daraus ergibt sich folgende finale Charakterisierung für den subgenomischen Promotor des MNV, welche in Abbildung 4.30 dargestellt ist.

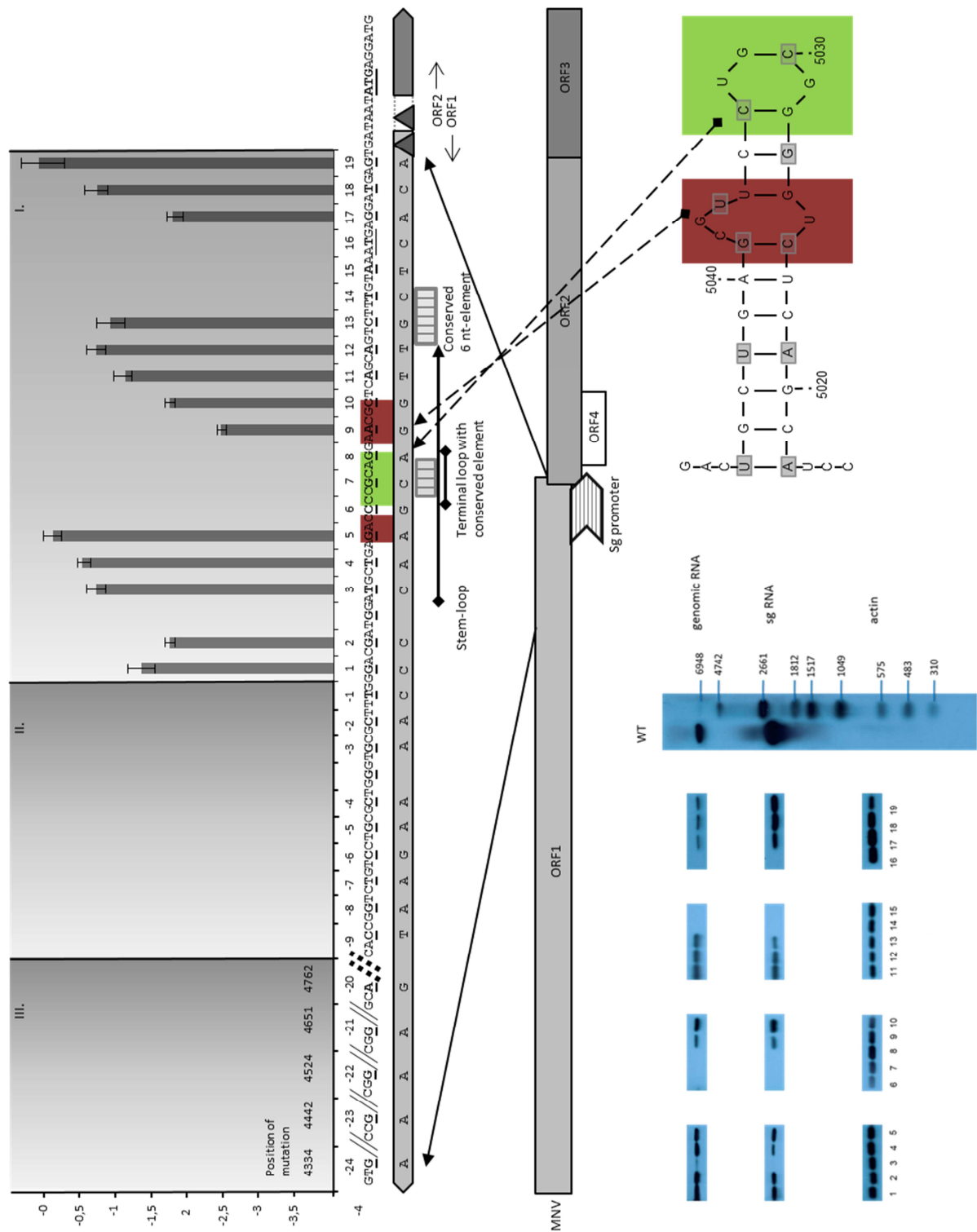


Abb. 4.30: Zusammenfassung der subgenomischen Promotorstudie des MNV.

Abb. 4150: Zusammenfassung der subgenomischen Promotorstudie des MNV.
Im Diagramm sind alle Mutanten mit den jeweiligen relativen Replikationseffizienzen im „auseinandergezogenen“ Kontext dargestellt. Der linke Diagramm-Abschnitt zeigt die 5'- Promotorvarianten. Darunter befinden sich die mutierten Triplets und eine Genom-Übersicht des MNV. Des Weiteren sind der Stem-Loop des Promotors und die Charakterisierung der Mutanten 1-19 durch den Northern Blot abgebildet.

5. DISKUSSION

5.1 Reverse Genetik

Wichtige Aspekte der Replikation und Pathogenese von Norovirus-Infektionen sind noch unbekannt und lassen sich nur unter großen Schwierigkeiten im Labor untersuchen, da humane Noroviren nicht *in-vitro* replizieren. Das murine Norovirus wurde 2003 entdeckt [18] und gilt wegen seiner genetischen Ähnlichkeit und dem vorhandenen Zellkultursystem als Surrogat für humane Noroviren. Die Methodik der reversen Genetik stellt dabei ein nützliches molekularbiologisches Hilfsmittel dar, um die Funktion viraler Gene im direkten Zusammenhang mit der Virusreplikation zu analysieren. In dieser Studie wurde deshalb ein leicht zu handhabendes und effizientes reverses Genetiksystem für das murine Norovirus entwickelt. Zur Etablierung wurde ein cDNA-Klon mit molekularbiologischen Standardtechniken wie reverse Transkription, Amplifikation, gerichtete Mutagenese und Klonierung in ein entsprechendes Vektorsystem konstruiert. Das MNV-Genom sollte dabei direkt im Zytoplasma in Form von RNA bereitgestellt werden. Dieses Verfahren nutzt ein T7 RNA-Polymerase Promotor-System für die *in-vitro* Transkription von gecappter, infektiöser RNA. Zusätzlich sollte die DNA-Präparation so einfach und effizient wie möglich durchgeführt werden. Deshalb wurde das low-copy Vektorsystem pSMART verwendet, da dieses eine sehr gute Plasmid-Stabilität bei gleichzeitig hoher Ausbeute an DNA liefert [169, 170]. Der pSMART Vektor ist zudem vorverdaut, mit dephosphorylierten blunt-Enden versehen und produziert laut Herstellerangaben (Lucigen, Middleton) 99,5% rekombinante Klone in typischen Experimenten. Dieser extrem niedrige Hintergrund an leeren Vektoren (0,05%) minimierte in dieser Arbeit das Auftreten aufwendiger Screening-Experimente.

Der erhaltene MNV-Stamm wurde zunächst resequenziert und zeigte im Alignment mit diversen MNVs insgesamt sieben Mutationen zum Stamm Berlin DE/06/06. Im Gegensatz zu RNA-Viren mit größeren Genomen verlief die Generierung des infektiösen cDNA-Klons aufgrund des kleinen viralen Genoms (ca. 7400 bp) weitgehend problemlos [169, 170]. Fünf Subklone wurden hergestellt, ligiert und *in-vitro* transkribiert, bevor die RNA in BHK-J Zellen elektroporiert werden konnte. Drei weitere getestete Zelllinien (RIGI ko, MDA5 ko, RAW264.7) ließen sich nicht gleichermaßen wirksam elektroporieren und erbrachten deutlich niedrigere Virustiter (Abbildung 4.18). Um mit einem jeweils fehlerfreien Plasmid zu arbeiten, wurden DNA-Minipräparationen, die im weiteren Verlauf für den Zusammenbau der Konstrukte oder für *in-vitro* Transkriptionen dienten, vollständig sequenziert. Außerdem wurde die Anwendung der kompetenten One Shot® Stbl3™ Bakterien an Stelle von One

Shot® TOP10™ (beide Invitrogen, Karlsruhe) vorgezogen, da eine zu hohe Neumutationsrate sowie ein Verlust größerer Inserts (≥ 5000 bp) bei One Shot® TOP10™ beobachtet wurde.

Die Transfektion von post-transkriptional enzymatisch gecappter RNA in BHK-J Zellen ermöglichte eine gute Ausbeute an rekombinanten Viren, jedoch ohne eine anschließende Amplifikation des Virusgenoms durch Reinfektion. Dieses Verfahren ist dennoch nützlich, um den Effekt spezifischer Mutationen viraler Proteine oder RNA-Strukturen innerhalb des Norovirus-Genoms zu quantifizieren, da die Ausbeute an infektiösen Viren das unmittelbare Resultat einer einzelnen Runde Virus-Replikation ist. Die Transfektion von synthetisch gecappter genomischer RNA durch das in dieser Arbeit beschriebene System lieferte eine Konzentration an rekombinantem MNV von mind. 1×10^4 PFU/ml (Abbildung 4.18B). Aufgrund der Kombination einer Elektroporation der RNA in BHK-J Zellen und der anschließenden Quantifizierung durch die murine Makrophagenzelllinie RAW264.7 gelang es, eine effiziente Methode zur Produktion rekombinanter Viren in permissiven Zellen zu entwickeln.

Für das murine Norovirus sind bereits drei verschiedene reverse Genetiksysteme verfügbar. Diese publizierten Methoden sind jedoch sehr zeit- und arbeitsintensiv oder benötigen Unterstützung durch ein zusätzliches Helfervirus, um die T7-Polymerase freizusetzen [151, 153]. Das zuletzt 2010 von Goodfellow *et al.* veröffentlichte reverse Genetiksystem für MNV stellte erstmalig eine Methode vor, durch die sogar susceptible RAW264.7 Zellen effektiv mittels des neuen Elektroporationssystems „Neon“ (Invitrogen, Karlsruhe) transfiziert werden können [154]. Der einschlägige Vorteil des Systems liegt dabei in einer elektronischen Pipettenspitze, welche als Transfektionskammer fungiert und worin ein gleichmäßiges elektrisches Feld erzeugt wird. Dieses neue Elektroporationssystem soll eine höhere Effizienz und Zelllebensfähigkeit erreichen, verglichen mit herkömmlichen Küvetten-basierten Systemen.

In dieser Arbeit wurden optimierte Transfektionsbedingungen ermittelt, indem verschiedene Techniken und Zelllinien getestet und miteinander verglichen wurden. Als die effizienteste Methode stellte sich die Elektroporation von BHK-J Zellen mittels Gene Pulser MXCell™ (Elektroporationssystem der Fa. Biorad) heraus. Dieses System ermöglichte eine schnelle und nahtlose Transfektion mit der zusätzlichen Option, sogar Primärzellen zu elektroporieren. Die Reproduzierbarkeit der Daten spielte eine grundlegende Rolle und konnte im Verlauf dieser Arbeit als äußerst hoch eingestuft werden. Das durch Goodfellow *et al.* vorgeschlagene „Neon“ Transfektionssystem der Firma Invitrogen wurde ebenfalls für die Elektroporation von RAW264.7 Zellen getestet. In unseren Versuchen konnten dadurch jedoch keine rekombinanten Viren in RAW264.7 Zellen produziert werden. Trotz vieler Wiederholungen, neu erhaltener Zellen und der exakten Einhaltung des Protokolls führte keine Anwendung des Neon® zum gewünschten Erfolg. Dieses Resultat und die Tat-

sache, dass die Arbeitsgruppe selbst in allen darauffolgenden Publikationen nicht mehr auf die Methodik verweist, lässt die Vermutung aufkommen, dass es dem Transfektionssystem an ausreichend Stabilität und Effizienz fehlt.

5.2 Optimierung des reversen Genetiksystems für MNV

Um eine effiziente Mutagenese für MNV zu erreichen, wurde die in dieser Arbeit entwickelte Methodik hinsichtlich ihrer Anwendung weiter optimiert. Dies war erforderlich, um durch viele parallel hergestellte Mutanten ganze RNA-Abschnitte in ihrer Funktionalität zu untersuchen, wie im vorliegenden Fall eine komplexe RNA-Struktur, die sich für die virale Replikation als essentiell darstellt. Dies sollte aufgrund des kleinen viralen Genoms über ein gecapptes Transkript, generiert aus einem einfachen PCR-Produkt, umgesetzt werden. Durch zwei außerhalb des Virusgenoms liegende Primer, versehen mit T7-Promotor und polyA-Schwanz, wurde ein MNV full-length PCR-Produkt in nur einem kurzen Arbeitsschritt amplifiziert. Als Polymerase diente dabei die Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, Frankfurt/Main), die sich durch eine hohe Amplifikationsgeschwindigkeit (1 kb/10 sec) und einer Proofreading-Funktion auszeichnet. Dadurch konnten PCR-Produkte schnell generiert werden. Laut Herstellerangaben (NEB) weist die Phusion® Polymerase eine Fehlerrate von $4,4 \times 10^{-7}$ auf, was ungefähr 50-fach niedriger ist als bei der *Taq* Polymerase. Zudem ist die Prozessivität 10-fach höher als bei der *Pfu* Polymerase bei einem geringen DNA-Input von höchstens 50 ng pro Reaktion. Das MNV-Genom konnte dadurch schnell und präzise amplifiziert, aufgereinigt und direkt als Template für die *in-vitro* Transkription eingesetzt werden. Im Vergleich zu den vorangegangenen Plasmid-basierten Arbeiten, lieferte diese Verfahrensweise sogar einen leichten Vorteil im Viruswachstum (Abbildung 4.19C/D). Ein Grund dafür könnte der geringe bakterielle Hintergrund sein, wodurch ein effizienteres Elektroporieren ermöglicht wurde. Durch die Verwendung eines PCR-Produktes als Template für die *in-vitro* Transkription unterscheidet sich dieses reverse Genetiksystem von allen bisher für MNV publizierten Methoden. Zudem ist es sehr leicht in der Handhabung und benötigt keine Unterstützung durch ein Helfervirus. Ebenso entfallen zeitaufwendige Linearisierungen von Plasmiden sowie Transformationen von kompetenten Bakterien.

Die Schnelligkeit der Herstellung infektiöser RNA sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit für ein umfangreiches Mutations-Scanning des subgenomischen MNV-Promotors genutzt werden. Eine hohe Anzahl an Mutanten wurde in kürzester Zeit durch einfache PCRs generiert. Das MNV Genom wurde dafür in zwei Segmente geteilt, welche zunächst in einer ersten PCR mit den entsprechenden

Mutagenese-Primern unabhängig voneinander amplifiziert wurden (Abbildung 4.19A). In einer anschließenden zweiten PCR konnten beide Teilstücke durch einen kurzen überlappenden, die Mutation tragenden Sequenzabschnitt zu einer viralen cDNA mit integrierter Mutation fusioniert werden. Optimierte PCR-Bedingungen wurden in einer Vielzahl von Experimenten bestimmt, da Fusionen in dieser Größenordnung (ca. 7400 bp) teilweise starke Nebenbanden produzieren. Um jedoch ein qualitativ hochwertiges Transkript zu generieren, war ein sauberes DNA-Template notwendig. Nach der *in-vitro* Transkription und der Transfektion der mutierten und gecappten MNV-RNA in BHK-J Zellen wurden schließlich Virus-Titer erreicht, die im Bereich der Wildtyp-Replikation lagen (Abbildung 4.19C/D). Somit resultierte durch diese vereinfachte und schnelle Arbeitsweise kein nachteiliger Effekt hinsichtlich des Viruswachstums.

Zudem wurden weitere Mutagenese-Verfahren getestet und miteinander verglichen, um schließlich ein optimal aufeinander abgestimmtes System zu entwickeln. Dazu zählte vor allem die Testung diverser PCR-basierter Mutagenese Kits, sog. Site-Directed Mutagenesis Kits. Technisch gesehen bieten diese Kits eine sehr robuste Verfahrensweise, jedoch unter einem zu hohen Zeitaufwand und einer eher geringen Ausbeute an positiven Klonen. Nur eine von drei Kolonien trug ein korrektes Insert, im Fall eines mutierten full-length cDNA Klons (eigene Beobachtung). Durch Extensions-PCR war es jedoch möglich, lange DNA-Fragmente ohne unerwünschte Mutationen zu erhalten. Wenn eine PCR-basierte Mutation in einem der ersten Zyklen der Amplifikation auftritt, würden alle nachfolgenden PCR-Produkte diese Mutation ebenso tragen. Ohne die extrem niedrige Fehlerrate der Phusion® Polymerase wäre demnach eine Extensions-PCR von großen Fragmenten weniger erfolgreich. Sequenzierungen der mutierten cDNA-Klone bestätigten jedoch die hohe Präzision der Polymerase. Dadurch konnte ein weiterer Vorteil für das reverse Genetiksystem zur Generierung rekombinanter Viren ermittelt werden.

In dieser vorliegenden Arbeit wurde schließlich ein schnelles Mutagenese-System für MNV etabliert, welches in der Lage ist, den Effekt von spezifischen Mutationen an RNA-Strukturen innerhalb des Norovirus-Genoms quantitativ vergleichend zu untersuchen.

5.3 Mapping des subgenomischen Promotors

Eine Anwendung des entwickelten reversen Genetiksystems für MNV sollte in dem gezielten Scanning des subgenomischen Promotors stattfinden. Dieser für die Virusreplikation essentielle Genomabschnitt ist innerhalb der Familie der Caliciviren hochkonserviert und besteht zudem aus einer charakteristischen Stem-Loop Struktur (Abbildung 1.4).

Nach dem Eintritt des Virus in die Wirtszelle und der Synthese der Nichtstrukturproteine wird zunächst eine full-length Minusstrang-Kopie des gesamten MNV-Genoms generiert. Diese RNA dient als Template für zwei Plusstrang-RNAs, die genomische und die subgenomische RNA [123, 127]. Beim murinen Norovirus ist die subgenomische RNA ungefähr 2400 Nukleotide (nt) lang und codiert die Strukturproteine sowie das Produkt von ORF4 [140]. Ähnlich wie bei den gut untersuchten Alphaviren wird die Synthese der subgenomischen RNA von einem subgenomischen Promotor gesteuert [171-173]. Die Minusstrang-Kopie des MNV-Genoms besitzt gleich zwei dieser Regionen, eine am 3'-Genomende, die für die Synthese der genomischen RNA verantwortlich ist und eine zweite interne Promotorregion, welche die Synthese der subgenomischen RNA kontrolliert. Die Aufklärung der RNA-Sekundärstrukturen für verschiedene humane und animale Caliciviren im Jahr 2008 unterstreicht diese Theorie und offenbart einen wahrscheinlich konservierten Mechanismus für die Initiierung des subgenomischen Transkripts [83]. Der RdRp-Komplex interagiert scheinbar mit dem Stem-Loop des Promotors, um die Transkription zu starten bzw. durch die Synthese der Strukturproteine zu kontrollieren.

In einer Studie des subgenomischen Promotors von RHDV, der bisher einzigen Promotoranalyse bei Caliciviren [157], wurde zunächst von einer Genom-unabhängigen „Replikation“ der subgenomischen RNA ausgegangen. Gründe dafür waren die Präsenz von subgenomischer RNA in Viruspartikeln sowie viele identische Eigenschaften dieser RNA im Vergleich mit genomischer RNA. Darunter zählt vor allem die kovalente Bindung des VPg am 5'-Terminus und dessen hohe Ähnlichkeit mit der Nukleotidsequenz des 5'-Endes der genomischen RNA. Die Analyse des subgenomischen Promotors von RHDV zeigte, dass 50 Nukleotide vor dem Start der subgenomischen RNA ausreichend sind, um eine volle Aktivität des Promotors zu erlangen. Die Produktion von subgenomischer RNA ist demnach das Ergebnis eines internen Initiationsmechanismus, wodurch das Virus in der Lage ist, einzelne Prozesse der RNA-Synthese zu kontrollieren und so ein geeignetes Gleichgewicht zwischen den Spaltprodukten des ORF1 und den Strukturproteinen einzustellen. Da bisher dieser subgenomische Promotor für Noroviren nicht untersucht wurde, wurde in dieser Arbeit eine gezielte Mutationsanalyse eröffnet, um den Einfluss spezifischer Basenpaare auf die Synthese der subgenomischen RNA und den daraus resultierenden Auswirkungen auf die Virusreplikation zu

untersuchen. Außerdem sollte ein Mapping dieser Region zusätzliche Informationen über die exakte Größe und Aktivität des subgenomischen Promotors bei Noroviren liefern.

Eine Vielzahl an Mutanten wurde für diese Promotorstudie generiert, die jeweils ein oder zwei mutierte Nukleotide tragen und sich über den gesamten Stem-Loop sowie die daran angrenzenden Sequenzabschnitte in 5' bzw. 3'-Richtung erstrecken (Abbildung 4.25). Unter Einhaltung des genetischen Codes wurde jeweils die dritte Position eines Basentriplets mutiert, um auf diese Weise einen Aminosäureaustausch zu verhindern. Als eine unmittelbare Beobachtung zeigte sich bereits nach kurzer Zeit, dass es sich bei der subgenomischen Promotorregion um einen existenziellen Bereich für das Virus handelt, in dessen Zentrum (untere Ringstruktur) nahezu kein Basenaustausch toleriert wird. Eine Analyse der letalen Punktmutationen im Stem-Loop zeigte, dass jegliche strukturelle Veränderung sich nachteilig auf die Virus-Replikation auswirkt (Abbildung 4.23A/B). Stärker verdeutlicht wurde dieser Aspekt durch die Generierung von Zweifachmutanten. Mutationen innerhalb der Stem-Loop Struktur führten an dieser Stelle zu keinerlei Viruswachstum, da scheinbar eine zu große Destabilisierung der Ringstrukturen erfolgte. Als ein weiterer Kern des Promotors wurde der 12 nt lange Spacerbereich identifiziert, welcher sich direkt nach der Stem-Loop Struktur in 3'-Richtung des Genoms befindet. Diese hochkonservierten Nukleotide reagierten äußerst empfindlich, so dass nur eine replizierende Mutante für dieses Segment charakterisiert werden konnte. Ein Auseinanderziehen der beiden überlappenden ORFs (ORF1 und ORF2) führte dagegen zu einem sehr gut replizierenden Virus, dem sog. Virus 8. Auch die daraufhin im „auseinandergezogenen“ Kontext in das MNV-Genom eingeführten Transitionen in 3'-Richtung zeigten eine deutliche Replikation (Abbildung 4.24). Dabei war zu beobachten, dass je stärker die Mutation sich an ORF2 näherte, das Viruswachstum anstieg. Somit konnte gezeigt werden, dass in diesem Genomabschnitt die Virussequenz für die Initiierung der subgenomischen RNA-Synthese nicht mehr essentiell ist.

Ein gezieltes Mapping des angrenzenden 5'-Genomabschnittes unterlag jedoch größeren Schwierigkeiten. Die ersten neun generierten Mutanten der vor dem Promotor liegenden Sequenz zeigten bereits keine Replikation. Deshalb wurde der zu mutierende Sequenzabschnitt vergrößert. Statt jeden Basentriplets wurde nur noch jedes zehnte Triplet mutiert. Jedoch führte diese Erweiterung erneut zu keinen replizierenden Viren. Verbesserte Versuchsbedingungen wurden erst durch die Klonierung der 5'-Promotormutanten in das Vektorsystem pSMART (Lucigen, Middleton) erzielt. Durch Sequenzierungsreaktionen der Matritzen-DNA konnten möglicherweise unbemerkt aufgetretene Neumutationen ausgeschlossen werden. Zudem wurde auf diese Weise ein sauberes Transkript, ohne Nebenbanden produziert. Die zuvor erhaltenen Ergebnisse wurden jedoch erneut

bestätigt. Das Virus toleriert keine einzige Mutation in einer vor dem Promotor liegenden Sequenz von fast 1000 Nukleotiden. Dieses Ergebnis belegt, dass eine genaue Bestimmung des Promotors in 5'-Richtung nicht möglich ist, da die mutagenisierten Sequenzelemente wahrscheinlich noch andere essentielle Funktionen erfüllen. Für das Virusgenom könnte es von Bedeutung sein, dass die RNA insgesamt in größeren und komplexeren Faltungsstrukturen vorliegt, welche jedoch durch die eingeführten Mutationen gestört wurden. Zudem befindet sich der für die virale Replikation wichtige RdRp-Komplex in diesem Sequenzabschnitt.

Diese Mutationsanalyse liefert die bisher ersten Informationen über die Aktivität und Lage des subgenomischen Promotors bei Noroviren und dessen Einfluss auf das Viruswachstum *in-vitro*.

5.4 Analyse der Auswirkungen des mutierten subgenomischen Promotors auf das virale Transkriptions- und Translationslevel

Zusätzliche Informationen über den Einfluss von Mutationen des subgenomischen Promotors auf das MNV-Transkriptions- bzw. Translationsniveau sollten durch Northern und Western Blot ermittelt werden.

Alle Promotormutanten mit einer Mutation im und um den Stem-Loop herum wurden durch eine DIG-gelabelte RNA-Sonde, die im Bereich des großen Kapsidproteins VP1 bindet, analysiert. Durch dieses Verfahren sollte vor allem beobachtet werden, ob nichtreplizierende Mutanten trotzdem in der Lage sind, eine subgenomische oder genomische RNA zu produzieren. Das Resultat dieser Northern Blot-Untersuchung war eindeutig (Abbildung 4.27). Alle replizierenden Mutanten mit einem Basenaustausch im Bereich des subgenomischen Promotors zeigten deutliche Banden für beide RNA-Spezies. Die genomische RNA wurde mit einer Größe von ca. 7400 bp und die subgenomische RNA mit ca. 2400 bp durch die DIG-gelabelte RNA-Sonde nachgewiesen. Für nichtreplizierende Promotormutanten konnte keine der beiden RNA-Spezies detektiert werden. Zudem wurde festgestellt, dass durch eine MNV-Infektion die Synthese der genomischen und subgenomischen RNA, trotz verschiedener Mutationen im subgenomischen Promotor, zu gleichen Anteilen stattfindet. Dieses Resultat unterstreicht die Theorie einer abhängigen RNA-Synthese für beide Spezies.

Die Analyse der Promotormutanten durch Western Blot zeigte einen ähnlichen Ausgang. Die Antikörper gegen das große Kapsidprotein VP1 und das Nichtstrukturprotein RdRp zeigten für nichtreplizierende Promotormutanten kein Signal. Im Gegensatz dazu konnten replizierende Mutanten klar und deutlich im Western Blot durch beide Antikörper nachgewiesen werden (Abbildung 4.28). Der Kapsid-Antikörper stellte eine charakteristische Bande bei 59 kDa dar, und der Polymerase-Antikörper detektierte bei 57,5 kDa ein typisches Signal.

Dieses Ergebnis belegt, dass nichtreplizierende Mutanten weder eine subgenomische RNA, noch auf dieser RNA kodierte Proteine generieren. Mutationen des subgenomischen Promotors beeinflussen daher nicht nur die subgenomische RNA-Synthese, sondern kontrollieren auch die vollständige Virus-Replikation.

5.5 Das „auseinandergezogene“ Virus 8

Bisherige Studien diverser RNA Viren belegen, dass überlappende offene Leserahmen (ORFs) oftmals von Viren genutzt werden, um die Kodierungskapazität kleiner RNA-Genome zu maximieren [174]. Diese ORFs und die darauf kodierten Proteine spielen in den meisten Fällen eine zusätzliche Rolle im viralen Lebenszyklus, wie z.B. die Mobilisierung der Immunantwort der Wirtszelle bei einer Infektion [175, 176]. Durch das kürzlich entdeckte ORF4, welches vollständig mit ORF2 überlappt sowie den überlappenden Bereich zwischen ORF1 und ORF2, zählt auch das MNV zu den Viren, die diese Strategie zur Maximierung ihres Kodierungspotentials verfolgen [140].

In dieser Arbeit wurde zur Ergänzung der subgenomischen Promotorstudie in 3'-Richtung diese Überlappung zwischen ORF1 und ORF2 aufgehoben, durch eine kurze Sequenz aufgefüllt und dupliziert (Abbildung 4.24A). Das Genom des sog. Virus 8 wurde dadurch um 17 Nukleotide verlängert, anschließend als PCR-Produkt *in-vitro* transkribiert und in BHK-J Zellen elektroporiert. In einem Vergleich mit der Replikation von WT-MNV und rMNV konnte kein nachteiliger Effekt festgestellt werden. Demzufolge wurden zur vollständigen Charakterisierung des subgenomischen Promotors vier weitere Mutanten im „auseinandergezogenen“ Kontext über Extensions-PCR amplifiziert, welche eine Transition direkt am 3'-Ende von ORF1 trugen (Abbildung 4.24C). Jede dritte Base eines Triplets wurde unter Einhaltung des genetischen Codes mutiert. Im Resultat stieg das Viruswachstum an, je näher die Mutation an den Grenzbereich von ORF1/ORF2 vorrückte. Die Mutante V8.1 besaß den Basenaustausch im ursprünglichen Startcodon ATG (T→C) von ORF2 und zeigte nach der Elektroporation als einziges mutiertes Virus keine Replikation. Demnach tolerierten diese „auseinandergezogenen“ Viren sogar Mutationen in Form einer Transition. Das erste ATG schien jedoch weiterhin eine grundlegende Rolle bei der Virusreplikation zu spielen. Deshalb wurden drei weitere Mutanten generiert; V8_Del, V8_Ala und V8_Ins. Auch sie besaßen den „auseinandergezogenen“ duplizierten Bereich zwischen ORF1 und ORF2, um die Funktion des zweiten ATGs, also das „neue“ Start-Codon von ORF2, zu analysieren. Bei Mutante V8_Ala wurde das vollständige ATG durch GCG ersetzt, was auf Aminosäureebene zu einem Austausch von Methionin zu Alanin führte. Die Transfektion dieser RNA ergab eine sehr gut replizierende Mutante. Im Vergleich zum unmutierten Virus 8 wies V8_Ala ein etwas geringeres Wachstum auf. V8_Ins und V8_Del bewirkten durch die Deletion bzw. Insertion von Thymin einen Frameshift vor dem zweiten „neuen“ ATG. Da jedoch beide Mutanten an dieser Stelle nicht replizierten, konnte dadurch gezeigt werden, dass das zweite ATG nicht als Start-Codon für ORF2 fungiert, sondern das erste „ursprüngliche“ ATG.

Diese Experimente verdeutlichen, dass obwohl ORF1 und ORF2 getrennt und 17 zusätzliche Nukleotide an dieser Position in das Virusgenom inseriert wurden, kein nachteiliger Effekt auf die Replikation des MNV resultierte. Eine durchgeführte Wachstumskinetik belegte ein dem Wildtyp identisches Verhalten. In zukünftigen Studien könnte daher dieser „auseinandergezogene“ Kontext genutzt werden, um eine exogene Sequenz zu inserieren. Durch die Insertion einer Luciferase oder eines fluoreszierenden Proteins könnte unter Umständen ein Reportervirus hergestellt werden.

Ein Reportervirus stellt ein wichtiges Hilfsmittel in der modernen Molekularbiologie dar, wodurch weitere Informationen über virale Proteine und ihre Interaktionspartner sowie über den gesamten Lebenszyklus erhalten werden können. Bisher wurde jedoch von keinen Reporterviren innerhalb der Gattung *Norovirus* berichtet. Eine Studie von Thorne *et al.* zeigte kürzlich die Insertion eines FLAG Tags (Oktapeptid) durch eine aufwendige Transposonmutagenese an spezifischen Positionen im NS4 und VP2 des MNV [140]. In dieser vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Viren charakterisiert, die sogar eine Insertion mit der doppelten Nukleotidanzahl tragen.

Als ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt für die Generierung eines Reportervirus kann die präzise Charakterisierung des subgenomischen Promotors fungieren. Durch dessen Duplikation und der daran anschließenden Insertion eines Reportergens könnte ein replizierendes Virus entstehen. Für das Alphavirus Chikungunya konnte genau diese Theorie bereits umgesetzt werden. Ein GFP wurde hinter dem duplizierten subgenomischen Promotor direkt vor den Strukturproteinen sowie am 3'-Genomende in das Chikungunya-Virusgenom eingefügt. Die resultierenden Reporterviren replizierten ähnlich stark wie der Chikungunya-Wildtyp [177]. Diese Dissertation liefert daher einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung viraler Funktionen rund um den subgenomischen Promotor des MNV und bietet erfolgversprechende Möglichkeiten, um erstmalig ein Reportervirus für Noroviren herzustellen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Das Norovirus gilt nach aktuellen epidemiologischen Studien als der wichtigste Erreger akuter viraler Gastroenteritiden weltweit. In der Norovirus-Forschung ist es schwierig, neue Informationen über den Lebenszyklus und die Pathogenese zu erhalten, da humane Noroviren nicht *in-vitro* replizieren. Das murine Norovirus (MNV) wurde 2003 entdeckt und gilt wegen seiner genetischen Ähnlichkeit und dem vorhandenen Zellkultursystem als experimentelles Surrogat für humane Noroviren.

In dieser Arbeit wurde ein leicht zu handhabendes und effizientes reverses Genetiksystem für MNV entwickelt. Das Verfahren basiert auf einem T7 RNA-Polymerase-Promotor-System für die *in-vitro* Transkription von gecappter, infektiöser RNA, welche über die Transfektion in BHK-J Zellen zu einer effizienten Ausbeute an rekombinanten MNV führt. Durch die Verwendung eines PCR-Produktes als Template für die *in-vitro* Transkription unterscheidet sich dieses reverse Genetiksystem von allen bisher für MNV publizierten Methoden. Neben der Zeitersparnis bietet das Verfahren den Vorteil, dass auf die Unterstützung eines Helfervirus verzichtet werden kann.

Dieses reverse Genetiksystem diente als Basis einer Mutagenesestudie des subgenomischen Promotors. Bei Caliciviren besteht der Promotor aus einer Stem-Loop Struktur, welche sich kurz vor ORF2 befindet. Ein systematisches Scanning dieses Sequenzabschnittes durch Einfach- und Doppelmutanten erfolgte. Die Analyse der letalen Punktmutationen im Stem-Loop zeigte, dass jegliche strukturelle Veränderung sich nachteilig auf die Virus-Replikation auswirkt. Zweifachmutanten bestätigten dieses Ergebnis, da in korrespondierenden Strukturelementen replizierende Doppelmutanten dann erhalten werden konnten, wenn die Mutationen eine in der Einzelmutante verloren gegangene Basenpaarung wiederherstellten. Ein Scanning des angrenzenden 5'-Genomabschnittes zeigte keine tolerierte Mutation, bei einer vor dem Promotor liegenden Sequenz von fast 1000 Nukleotiden. Eine genaue Bestimmung des subgenomischen Promotors in 5'-Richtung war nicht möglich, da die mutagenisierten Sequenzelemente wahrscheinlich noch andere essentielle Funktionen übernehmen.

Nichtreplizierende Promotormutanten zeigten weder auf der Transkriptions- noch auf der Translationsebene Aktivität im Northern- oder Western Blot. Mutanten, die keine subgenomische RNA produzieren, exprimieren auch keine Nichtstrukturproteine. Demnach kontrolliert der subgenomische Promotor nicht nur die subgenomische RNA-Synthese, sondern auch die vollständige Virus-Replikation.

Durch Trennung von ORF1 und ORF2 und Insertion von 17 zusätzlichen Nukleotiden an dieser Position resultierte kein nachteiliger Effekt auf die Replikation. In Zukunft könnte deshalb die Insertion einer exogenen Sequenz eine Möglichkeit zur Herstellung eines Norovirus-Reportervirus liefern.

7. REFERENZEN

1. Zahorsky, *Hyperemesis hiemis or the winter vomiting disease*. Arch. Pediatr., 1929. **46**: p. 391-5.
2. Kapikian, A.Z., *The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective*. J Infect Dis, 2000. **181 Suppl 2**: p. S295-302.
3. Kapikian, A.Z., et al., *Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis*. J Virol, 1972. **10**(5): p. 1075-81.
4. Koch J., S.T., Stark K., Schreier E., *Norovirusinfektionen in Deutschland Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*, 2006. **49**: p. 296-309.
5. Xi, J.N., et al., *Norwalk virus genome cloning and characterization*. Science, 1990. **250**(4987): p. 1580-3.
6. Mayo, M.A., *A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV*. Arch Virol, 2002. **147**(8): p. 1655-63.
7. Bull, R.A., M.M. Tanaka, and P.A. White, *Norovirus recombination*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 12): p. 3347-59.
8. Lochridge, V.P. and M.E. Hardy, *A single-amino-acid substitution in the P2 domain of VP1 of murine norovirus is sufficient for escape from antibody neutralization*. J Virol, 2007. **81**(22): p. 12316-22.
9. Zheng, D.P., et al., *Norovirus classification and proposed strain nomenclature*. Virology, 2006. **346**(2): p. 312-23.
10. Ando, T., J.S. Noel, and R.L. Fankhauser, *Genetic classification of "Norwalk-like viruses"*. J Infect Dis, 2000. **181 Suppl 2**: p. S336-48.
11. Rockx, B.H., et al., *Association of histo-blood group antigens and susceptibility to norovirus infections*. J Infect Dis, 2005. **191**(5): p. 749-54.
12. Martella, V., et al., *Norovirus in captive lion cub (Panthera leo)*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(7): p. 1071-3.
13. Martella, V., et al., *Detection and molecular characterization of a canine norovirus*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(8): p. 1306-8.
14. Bull, R.A., et al., *Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(2): p. 327-33.
15. La Rosa, G., et al., *Detection of genogroup IV noroviruses in environmental and clinical samples and partial sequencing through rapid amplification of cDNA ends*. Arch Virol, 2008. **153**(11): p. 2077-83.
16. Smiley, J.R., et al., *Reverse transcription-PCR assays for detection of bovine enteric caliciviruses (BEC) and analysis of the genetic relationships among BEC and human caliciviruses*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(7): p. 3089-99.
17. Oliver, S.L., et al., *Molecular characterization of bovine enteric caliciviruses: a distinct third genogroup of noroviruses (Norwalk-like viruses) unlikely to be of risk to humans*. J Virol, 2003. **77**(4): p. 2789-98.
18. Karst, S.M., et al., *STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus*. Science, 2003. **299**(5612): p. 1575-8.
19. Wobus, C.E., et al., *Replication of Norovirus in cell culture reveals a tropism for dendritic cells and macrophages*. PLoS Biol, 2004. **2**(12): p. e432.
20. Blanton, L.H., et al., *Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004*. J Infect Dis, 2006. **193**(3): p. 413-21.
21. Siebenga, J.J., et al., *Gastroenteritis caused by norovirus GGII.4, The Netherlands, 1994-2005*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(1): p. 144-6.
22. Katayama, K., et al., *Phylogenetic analysis of the complete genome of 18 Norwalk-like viruses*. Virology, 2002. **299**(2): p. 225-239.

23. Chhabra, P., A.M. Walimbe, and S.D. Chitambar, *Molecular characterization of three novel intergenotype norovirus GII recombinant strains from western India*. *Virus Res*, 2010. **147**(2): p. 242-6.
24. Fankhauser, R.L., et al., *Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States*. *J Infect Dis*, 1998. **178**(6): p. 1571-8.
25. Fretz, R., et al., *Frequency of Norovirus in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms in Switzerland*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2005. **24**(3): p. 214-6.
26. Baert, L., et al., *Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health?* *Int J Food Microbiol*, 2011. **151**(3): p. 261-9.
27. Marks, P.J., et al., *Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant*. *Epidemiol Infect*, 2000. **124**(3): p. 481-7.
28. Lopman, B.A., et al., *Linking healthcare associated norovirus outbreaks: a molecular epidemiologic method for investigating transmission*. *BMC Infect Dis*, 2006. **6**: p. 108.
29. Friesema, I.H., et al., *Norovirus outbreaks in nursing homes: the evaluation of infection control measures*. *Epidemiol Infect*, 2009. **137**(12): p. 1722-33.
30. Baron, R.C., et al., *Norwalk gastrointestinal illness: an outbreak associated with swimming in a recreational lake and secondary person-to-person transmission*. *Am J Epidemiol*, 1982. **115**(2): p. 163-72.
31. Koopman, J.S., et al., *Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure*. *Am J Epidemiol*, 1982. **115**(2): p. 173-7.
32. D'Souza, D.H., et al., *Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food*. *Int J Food Microbiol*, 2006. **108**(1): p. 84-91.
33. Escudero, B.I., et al., *Persistence and transferability of noroviruses on and between common surfaces and foods*. *J Food Prot*, 2012. **75**(5): p. 927-35.
34. Lamhoujeb, S., et al., *Evaluation of the persistence of infectious human noroviruses on food surfaces by using real-time nucleic acid sequence-based amplification*. *Appl Environ Microbiol*, 2008. **74**(11): p. 3349-55.
35. Hutson, A.M., R.L. Atmar, and M.K. Estes, *Norovirus disease: changing epidemiology and host susceptibility factors*. *Trends Microbiol*, 2004. **12**(6): p. 279-87.
36. Iversen, A.M., et al., *Two outbreaks of foodborne gastroenteritis caused by a small round structured virus: evidence of prolonged infectivity in a food handler*. *Lancet*, 1987. **2**(8558): p. 556-8.
37. Atmar, R.L., et al., *Norwalk virus shedding after experimental human infection*. *Emerg Infect Dis*, 2008. **14**(10): p. 1553-7.
38. Wang, Q.H., et al., *Porcine noroviruses related to human noroviruses*. *Emerg Infect Dis*, 2005. **11**(12): p. 1874-81.
39. Jiang, B., et al., *Prevalence of rotavirus and norovirus antibodies in non-human primates*. *J Med Primatol*, 2004. **33**(1): p. 30-3.
40. Widdowson, M.A., et al., *Detection of serum antibodies to bovine norovirus in veterinarians and the general population in the Netherlands*. *J Med Virol*, 2005. **76**(1): p. 119-28.
41. Tian, P., et al., *Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells*. *Lett Appl Microbiol*, 2006. **43**(6): p. 645-51.
42. Kageyama, T., et al., *Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to Norovirus in Japan*. *J Clin Microbiol*, 2004. **42**(7): p. 2988-95.
43. Parrino, T.A., et al., *Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent*. *N Engl J Med*, 1977. **297**(2): p. 86-9.
44. Farkas, T., et al., *Homologous versus heterologous immune responses to Norwalk-like viruses among crew members after acute gastroenteritis outbreaks on 2 US Navy vessels*. *J Infect Dis*, 2003. **187**(2): p. 187-93.
45. Johnson, P.C., et al., *Multiple-challenge study of host susceptibility to Norwalk gastroenteritis in US adults*. *J Infect Dis*, 1990. **161**(1): p. 18-21.

46. Hutson, A.M., et al., *Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type*. J Infect Dis, 2002. **185**(9): p. 1335-7.
47. Tan, M. and X. Jiang, *Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: an answer to a historical puzzle*. Trends Microbiol, 2005. **13**(6): p. 285-93.
48. Sasaki, Y., et al., *Multiple viral infections and genomic divergence among noroviruses during an outbreak of acute gastroenteritis*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 790-7.
49. Papadopoulos, V.P., et al., *A gastroenteritis outbreak due to Norovirus infection in Xanthi, Northern Greece: management and public health consequences*. J Gastrointest Liver Dis, 2006. **15**(1): p. 27-30.
50. Gotz, H., et al., *Clinical spectrum and transmission characteristics of infection with Norwalk-like virus: findings from a large community outbreak in Sweden*. Clin Infect Dis, 2001. **33**(5): p. 622-8.
51. Kaufman, S.S., et al., *Calicivirus enteritis in an intestinal transplant recipient*. Am J Transplant, 2003. **3**(6): p. 764-8.
52. CDC, *Outbreak of Acute Gastroenteritis Associated with Norwalk-Like Viruses Among British Military Personnel - Afghanistan*. MMWR 2002. **51**: p. 477-479.
53. Green, K.Y., et al., *Homotypic and heterotypic epitope-specific antibody responses in adult and infant rotavirus vaccinees: implications for vaccine development*. J Infect Dis, 1990. **161**(4): p. 667-79.
54. Green, K.Y., et al., *A predominant role for Norwalk-like viruses as agents of epidemic gastroenteritis in Maryland nursing homes for the elderly*. J Infect Dis, 2002. **185**(2): p. 133-46.
55. Richardson, C., et al., *Norovirus virus-like particle vaccines for the prevention of acute gastroenteritis*. Expert Rev Vaccines, 2013. **12**(2): p. 155-67.
56. Parra, G.I., et al., *Immunogenicity and specificity of norovirus Consensus GII.4 virus-like particles in monovalent and bivalent vaccine formulations*. Vaccine, 2012. **30**(24): p. 3580-6.
57. Rockx, B., et al., *Natural history of human calicivirus infection: a prospective cohort study*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(3): p. 246-53.
58. Glass, R.I., et al., *The epidemiology of enteric caliciviruses from humans: a reassessment using new diagnostics*. J Infect Dis, 2000. **181 Suppl 2**: p. S254-61.
59. Atmar, R.L. and M.K. Estes, *The epidemiologic and clinical importance of norovirus infection*. Gastroenterol Clin North Am, 2006. **35**(2): p. 275-90, viii.
60. Widdowson, M.A., et al., *Outbreaks of acute gastroenteritis on cruise ships and on land: identification of a predominant circulating strain of norovirus--United States, 2002*. J Infect Dis, 2004. **190**(1): p. 27-36.
61. Dingle, K.E. and H. Norovirus Infection Control in Oxfordshire Communities, *Mutation in a Lordsdale norovirus epidemic strain as a potential indicator of transmission routes*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(9): p. 3950-7.
62. Kroneman, A., et al., *Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(9): p. 2959-65.
63. Bernard, H., et al., *Epidemiology of norovirus gastroenteritis in Germany 2001-2009: eight seasons of routine surveillance*. Epidemiol Infect, 2013: p. 1-12.
64. Lopman, B., et al., *Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant*. Lancet, 2004. **363**(9410): p. 682-8.
65. Widdowson, M.A., S.S. Monroe, and R.I. Glass, *Are noroviruses emerging?* Emerg Infect Dis, 2005. **11**(5): p. 735-7.
66. Bryce, J., et al., *WHO estimates of the causes of death in children*. Lancet, 2005. **365**(9465): p. 1147-52.
67. Patel, M.M., et al., *Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(8): p. 1224-31.

68. Trivedi, T.K., et al., *Clinical characteristics of norovirus-associated deaths: A systematic literature review*. Am J Infect Control, 2012.
69. Payne, D.C., et al., *Norovirus and medically attended gastroenteritis in U.S. children*. N Engl J Med, 2013. **368**(12): p. 1121-30.
70. Koh, H., et al., *Coinfection of viral agents in Korean children with acute watery diarrhea*. J Korean Med Sci, 2008. **23**(6): p. 937-40.
71. Albuquerque, M.C., et al., *Human bocavirus infection in children with gastroenteritis, Brazil*. Emerg Infect Dis, 2007. **13**(11): p. 1756-8.
72. Campe, H., C. Hartberger, and A. Sing, *Role of Human Bocavirus infections in outbreaks of gastroenteritis*. J Clin Virol, 2008. **43**(3): p. 340-2.
73. Manso, C.F. and J.L. Romalde, *Detection and Characterization of Hepatitis A Virus and Norovirus in Mussels from Galicia (NW Spain)*. Food Environ Virol, 2013. **5**(2): p. 110-8.
74. van Beek, J., et al., *Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012*. Euro Surveill, 2013. **18**(1): p. 8-9.
75. Lopman, B., M. Zambon, and D.W. Brown, *The evolution of norovirus, the "gastric flu"*. PLoS Med, 2008. **5**(2): p. e42.
76. Clarke, I.N. and P.R. Lambden, *Organization and expression of calicivirus genes*. J Infect Dis, 2000. **181** Suppl 2: p. S309-16.
77. Green, K.Y., *Caliciviridae: the noroviruses*, in *Fields Virology*. 2007, Lippincott Williams and Wilkins.
78. Marsh, M. and A. Helenius, *Virus entry into animal cells*. Adv Virus Res, 1989. **36**: p. 107-51.
79. Mikami, O., et al., *Hepatic lesions in young rabbits experimentally infected with rabbit haemorrhagic disease virus*. Res Vet Sci, 1999. **66**(3): p. 237-42.
80. Nilsson, M., et al., *Evolution of human calicivirus RNA in vivo: accumulation of mutations in the protruding P2 domain of the capsid leads to structural changes and possibly a new phenotype*. J Virol, 2003. **77**(24): p. 13117-24.
81. Green, K.Y., et al., *Taxonomy of the caliciviruses*. J Infect Dis, 2000. **181** Suppl 2: p. S322-30.
82. Fauquet, C.M., *Virus Taxonomy*, in *VIIIth Report of the international Committee on Taxonomy of Viruses*, M.A. Mayo, Maniolo, J., Desselberger, U., Ball, L.A. , Editor 2005: Elsevier/Academic Press, London.
83. Simmonds, P., et al., *Bioinformatic and functional analysis of RNA secondary structure elements among different genera of human and animal caliciviruses*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(8): p. 2530-46.
84. Smiley, J.R., et al., *Characterization of an enteropathogenic bovine calicivirus representing a potentially new calicivirus genus*. J Virol, 2002. **76**(20): p. 10089-98.
85. Oliver, S.L., et al., *Genomic characterization of the unclassified bovine enteric virus Newbury agent-1 (Newbury1) endorses a new genus in the family Caliciviridae*. Virology, 2006. **350**(1): p. 240-50.
86. Otto, P.H., et al., *Infection of calves with bovine norovirus GIII.1 strain Jena virus: an experimental model to study the pathogenesis of norovirus infection*. J Virol, 2011. **85**(22): p. 12013-21.
87. Day, J.M., et al., *Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community*. Virol J, 2010. **7**: p. 313.
88. Wei, C., et al., *Recovery of infectious virus by transfection of in vitro-generated RNA from tulane calicivirus cDNA*. J Virol, 2008. **82**(22): p. 11429-36.
89. L'Homme, Y., et al., *Genomic characterization of swine caliciviruses representing a new genus of Caliciviridae*. Virus Genes, 2009. **39**(1): p. 66-75.
90. Prasad, B.V., et al., *X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid*. Science, 1999. **286**(5438): p. 287-90.
91. Hardy, M.E., *Norovirus protein structure and function*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **253**(1): p. 1-8.

92. Allen, D.J., et al., *Analysis of amino acid variation in the P2 domain of the GII-4 norovirus VP1 protein reveals putative variant-specific epitopes*. PLoS One, 2008. **3**(1): p. e1485.
93. Lochridge, V.P., et al., *Epitopes in the P2 domain of norovirus VP1 recognized by monoclonal antibodies that block cell interactions*. J Gen Virol, 2005. **86**(Pt 10): p. 2799-806.
94. Tan, M. and X. Jiang, *The p domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors*. J Virol, 2005. **79**(22): p. 14017-30.
95. Green, K.Y., *Human caliciviruses*, in *Fields Virology*. 2001, Lippincott Williams and Wilkins
96. Rohayem, J., et al., *Antiviral strategies to control calicivirus infections*. Antiviral Res, 2010. **87**(2): p. 162-78.
97. Ossiboff, R.J., et al., *Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor*. J Virol, 2010. **84**(11): p. 5550-64.
98. Seah, E.L., et al., *Variation in ORF3 of genogroup 2 Norwalk-like viruses*. Arch Virol, 1999. **144**(5): p. 1007-14.
99. Meyers, G., C. Wirblich, and H.J. Thiel, *Genomic and subgenomic RNAs of rabbit hemorrhagic disease virus are both protein-linked and packaged into particles*. Virology, 1991. **184**(2): p. 677-86.
100. Bueno, A.C., et al., *Cardiopulmonary and sedative effects of intravenous administration of low doses of medetomidine and xylazine to adult horses*. Am J Vet Res, 1999. **60**(11): p. 1371-6.
101. Neill, J.D., *The subgenomic RNA of feline calicivirus is packaged into viral particles during infection*. Virus Res, 2002. **87**(1): p. 89-93.
102. Thiel, H.J. and M. König, *Caliciviruses: an overview*. Vet Microbiol, 1999. **69**(1-2): p. 55-62.
103. Ettayebi, K. and M.E. Hardy, *Norwalk virus nonstructural protein p48 forms a complex with the SNARE regulator VAP-A and prevents cell surface expression of vesicular stomatitis virus G protein*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11790-7.
104. Boniotti, B., et al., *Identification and characterization of a 3C-like protease from rabbit hemorrhagic disease virus, a calicivirus*. J Virol, 1994. **68**(10): p. 6487-95.
105. Sosnovtsev, S.V. and K.Y. Green, *Identification and genomic mapping of the ORF3 and VPg proteins in feline calicivirus virions*. Virology, 2000. **277**(1): p. 193-203.
106. Pfister, T. and E. Wimmer, *Polypeptide p41 of a Norwalk-like virus is a nucleic acid-independent nucleoside triphosphatase*. J Virol, 2001. **75**(4): p. 1611-9.
107. Liu, B., I.N. Clarke, and P.R. Lambden, *Polyprotein processing in Southampton virus: identification of 3C-like protease cleavage sites by in vitro mutagenesis*. J Virol, 1996. **70**(4): p. 2605-10.
108. Dunham, D.M., et al., *Genomic mapping of a calicivirus VPg*. Arch Virol, 1998. **143**(12): p. 2421-30.
109. Sosnovtseva, S.A., S.V. Sosnovtsev, and K.Y. Green, *Mapping of the feline calicivirus proteinase responsible for autocatalytic processing of the nonstructural polyprotein and identification of a stable proteinase-polymerase precursor protein*. J Virol, 1999. **73**(8): p. 6626-33.
110. Abente, E.J., et al., *The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect*. J Virol, 2013. **87**(6): p. 3003-17.
111. Leite, J.P., et al., *Characterization of Toronto virus capsid protein expressed in baculovirus*. Arch Virol, 1996. **141**(5): p. 865-75.
112. Jiang, X., et al., *Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein*. J Virol, 1992. **66**(11): p. 6527-32.
113. Bertolotti-Ciarlet, A., et al., *The 3' end of Norwalk virus mRNA contains determinants that regulate the expression and stability of the viral capsid protein VP1: a novel function for the VP2 protein*. J Virol, 2003. **77**(21): p. 11603-15.
114. Glass, P.J., et al., *Norwalk virus open reading frame 3 encodes a minor structural protein*. J Virol, 2000. **74**(14): p. 6581-91.

115. Glass, P.J., C.Q. Zeng, and M.K. Estes, *Two nonoverlapping domains on the Norwalk virus open reading frame 3 (ORF3) protein are involved in the formation of the phosphorylated 35K protein and in ORF3-capsid protein interactions*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3569-77.
116. Prasad, B.V., et al., *Structure of Norwalk virus*. Arch Virol Suppl, 1996. **12**: p. 237-42.
117. Sosnovtsev, S.V., et al., *Feline calicivirus VP2 is essential for the production of infectious virions*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4012-24.
118. Schaffer, F.L., et al., *A protein, VPg, covalently linked to 36S calicivirus RNA*. J Gen Virol, 1980. **47**(1): p. 215-20.
119. Herbert, T.P., I. Brierley, and T.D. Brown, *Identification of a protein linked to the genomic and subgenomic mRNAs of feline calicivirus and its role in translation*. J Gen Virol, 1997. **78** (Pt 5): p. 1033-40.
120. Daughenbaugh, K.F., et al., *The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment*. EMBO J, 2003. **22**(11): p. 2852-9.
121. Daughenbaugh, K.F., C.E. Wobus, and M.E. Hardy, *VPg of murine norovirus binds translation initiation factors in infected cells*. Virol J, 2006. **3**: p. 33.
122. Chakravarty, S., et al., *Evolutionary trace residues in noroviruses: importance in receptor binding, antigenicity, virion assembly, and strain diversity*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 554-68.
123. Sosnovtsev, S.V., M. Garfield, and K.Y. Green, *Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome*. J Virol, 2002. **76**(14): p. 7060-72.
124. Neill, J.D. and W.L. Mengeling, *Further characterization of the virus-specific RNAs in feline calicivirus infected cells*. Virus Res, 1988. **11**(1): p. 59-72.
125. Poyry, T.A., et al., *The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation*. Genes Dev, 2007. **21**(23): p. 3149-62.
126. Luttermann, C. and G. Meyers, *A bipartite sequence motif induces translation reinitiation in feline calicivirus RNA*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7056-65.
127. Napthine, S., et al., *Expression of the VP2 protein of murine norovirus by a translation termination-reinitiation strategy*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8390.
128. Sosnovtsev, S.V., et al., *Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells*. Virus Res, 2003. **94**(1): p. 1-10.
129. Abrantes, J., et al., *Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV): a review*. Vet Res, 2012. **43**(1): p. 12.
130. Hsu, C.C., et al., *Persistent infection with and serologic cross-reactivity of three novel murine noroviruses*. Comp Med, 2006. **56**(4): p. 247-51.
131. Henderson, K.S., *Murine norovirus, a recently discovered and highly prevalent viral agent of mice*. Lab Anim (NY), 2008. **37**(7): p. 314-20.
132. Kim, M., et al., *Molecular characterization of murine norovirus isolates from South Korea*. Virus Res, 2010. **147**(1): p. 1-6.
133. Kim, J.R., et al., *Prevalence of murine norovirus infection in Korean laboratory animal facilities*. J Vet Med Sci, 2011. **73**(5): p. 687-91.
134. Mahler, M. and W. Kohl, *A serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and Mycoplasma pulmonis in laboratory mice and rats in western Europe*. Lab Anim (NY), 2009. **38**(5): p. 161-5.
135. Muller, B., et al., *Genetic diversity and recombination of murine noroviruses in immunocompromised mice*. Arch Virol, 2007. **152**(9): p. 1709-19.
136. Thackray, L.B., et al., *Murine noroviruses comprising a single genogroup exhibit biological diversity despite limited sequence divergence*. J Virol, 2007. **81**(19): p. 10460-73.
137. McFadden, N., et al., *Norovirus regulation of the innate immune response and apoptosis occurs via the product of the alternative open reading frame 4*. PLoS Pathog, 2011. **7**(12): p. e1002413.

138. Changotra, H., et al., *Type I and type II interferons inhibit the translation of murine norovirus proteins*. J Virol, 2009. **83**(11): p. 5683-92.
139. Mumphrey, S.M., et al., *Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3251-63.
140. Thorne, L., D. Bailey, and I. Goodfellow, *High-resolution functional profiling of the norovirus genome*. J Virol, 2012. **86**(21): p. 11441-56.
141. Levis, R., S. Schlesinger, and H.V. Huang, *Promoter for Sindbis virus RNA-dependent subgenomic RNA transcription*. J Virol, 1990. **64**(4): p. 1726-33.
142. Adkins, S. and C.C. Kao, *Subgenomic RNA promoters dictate the mode of recognition by bromoviral RNA-dependent RNA polymerases*. Virology, 1998. **252**(1): p. 1-8.
143. Olsthoorn, R.C., et al., *A conformational switch at the 3' end of a plant virus RNA regulates viral replication*. EMBO J, 1999. **18**(17): p. 4856-64.
144. Bailey, D., et al., *Functional analysis of RNA structures present at the 3' extremity of the murine norovirus genome: the variable polypyrimidine tract plays a role in viral virulence*. J Virol, 2010. **84**(6): p. 2859-70.
145. Guix, S., et al., *Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(1): p. 133-9.
146. Neill, J.D., S.V. Sosnovtsev, and K.Y. Green, *Recovery and altered neutralization specificities of chimeric viruses containing capsid protein domain exchanges from antigenically distinct strains of feline calicivirus*. J Virol, 2000. **74**(3): p. 1079-84.
147. Sosnovtsev, S. and K.Y. Green, *RNA transcripts derived from a cloned full-length copy of the feline calicivirus genome do not require VpG for infectivity*. Virology, 1995. **210**(2): p. 383-90.
148. Sosnovtsev, S.V., S.A. Sosnovtseva, and K.Y. Green, *Cleavage of the feline calicivirus capsid precursor is mediated by a virus-encoded proteinase*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 3051-9.
149. Geissler, K., et al., *Feline calicivirus capsid protein expression and capsid assembly in cultured feline cells*. J Virol, 1999. **73**(1): p. 834-8.
150. Abente, E.J., et al., *Visualization of feline calicivirus replication in real-time with recombinant viruses engineered to express fluorescent reporter proteins*. Virology, 2010. **400**(1): p. 18-31.
151. Chaudhry, Y., M.A. Skinner, and I.G. Goodfellow, *Recovery of genetically defined murine norovirus in tissue culture by using a fowlpox virus expressing T7 RNA polymerase*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 8): p. 2091-100.
152. Bailey, D., L.B. Thackray, and I.G. Goodfellow, *A single amino acid substitution in the murine norovirus capsid protein is sufficient for attenuation in vivo*. J Virol, 2008. **82**(15): p. 7725-8.
153. Ward, V.K., et al., *Recovery of infectious murine norovirus using pol II-driven expression of full-length cDNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(26): p. 11050-5.
154. Yunus, M.A., et al., *Development of an optimized RNA-based murine norovirus reverse genetics system*. J Virol Methods, 2010. **169**(1): p. 112-8.
155. Asanaka, M., et al., *Replication and packaging of Norwalk virus RNA in cultured mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(29): p. 10327-32.
156. Guix, S., et al., *Human astrovirus C-terminal nsP1a protein is involved in RNA replication*. Virology, 2005. **333**(1): p. 124-31.
157. Morales, M., et al., *Synthesis in vitro of rabbit hemorrhagic disease virus subgenomic RNA by internal initiation on (-)sense genomic RNA: mapping of a subgenomic promoter*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 17013-8.
158. Daniels, R., et al., *Simian virus 40 late proteins possess lytic properties that render them capable of permeabilizing cellular membranes*. J Virol, 2006. **80**(13): p. 6575-87.
159. Vogelstein, B. and D. Gillespie, *Preparative and analytical purification of DNA from agarose*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 615-9.
160. Joseph Sambrook, E.F.F., Tom Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 1. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory.

161. Bernard, P. and M. Couturier, *Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes*. J Mol Biol, 1992. **226**(3): p. 735-45.
162. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
163. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
164. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Vol. 6. 2008: Spektrum Akademischer Verla.
165. Kück, *Praktikum der Molekulargenetik*. Vol. 1. 2004.
166. Holtke, H.J., et al., *The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids--an overview*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1995. **41**(7): p. 883-905.
167. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
168. Schagger, H. and G. von Jagow, *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa*. Anal Biochem, 1987. **166**(2): p. 368-79.
169. Yount, B., et al., *Reverse genetics with a full-length infectious cDNA of severe acute respiratory syndrome coronavirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12995-3000.
170. Pfefferle, S., et al., *Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-Coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuating function of the 7b protein in-vitro and in-vivo*. Virol J, 2009. **6**: p. 131.
171. Hertz, J.M. and H.V. Huang, *Evolution of the Sindbis virus subgenomic mRNA promoter in cultured cells*. J Virol, 1995. **69**(12): p. 7768-74.
172. Rayner, J.O., S.A. Dryga, and K.I. Kamrud, *Alphavirus vectors and vaccination*. Rev Med Virol, 2002. **12**(5): p. 279-96.
173. Li, W. and S.M. Wong, *Analyses of subgenomic promoters of Hibiscus chlorotic ringspot virus and demonstration of 5' untranslated region and 3'-terminal sequences functioning as subgenomic promoters*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3395-405.
174. Belshaw, R., O.G. Pybus, and A. Rambaut, *The evolution of genome compression and genomic novelty in RNA viruses*. Genome Res, 2007. **17**(10): p. 1496-504.
175. Conenello, G.M., et al., *A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence*. PLoS Pathog, 2007. **3**(10): p. 1414-21.
176. Coleman, J.R., *The PB1-F2 protein of Influenza A virus: increasing pathogenicity by disrupting alveolar macrophages*. Virol J, 2007. **4**: p. 9.
177. Tsetsarkin, K., et al., *Infectious clones of Chikungunya virus (La Reunion isolate) for vector competence studies*. Vector Borne Zoonotic Dis, 2006. **6**(4): p. 325-37.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
mM	Millimolar
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
CT	Cycle Threshold
d	Tag
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Elektroporation
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
IFN	Interferon
IVT	<i>in-vitro</i> Transkript
kb	Kilo-Basenpaare
k.o.	knock-out
MEFs	Embryonale Mausfibroblasten
min	Minuten
ml	Milliliter
MNV	murines Norovirus
MOI	Multiplizität der Infektion
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
ng	Nanogramm
nt	Nukleotide
ORF	Offener Leserahmen
p.i.	Post Infection
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS-Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PFU	Plaque Forming Units
RACE	Rapid Amplification of cDNA-Ends
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
rMNV	rekombinantes murines Norovirus
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunden
sg	subgenomisch
sg Promo	subgenomischer Promotor
SL	Stem-Loop
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
UTP	Uridintriphosphat
V8	Virus 8 (stretched Virus)

Erklärung zur Dissertation

Ich erkläre, dass ich

- die Dissertation persönlich, selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe,
- keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe,
- diese oder eine ähnliche Arbeit an keiner anderen Universität zur Erlangung eines Titels eingereicht habe,
- noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Bonn, den

Eva Neugebauer

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Christian Drosten, der mir stets mit seinem Fachwissen zur Seite stand und der durch seine Ideen und Anregungen in vielen konstruktiven Gesprächen zu einem wertvollen Wegbegleiter wurde.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Misof, der sich ohne zögern bereit erklärt hat, meine Arbeit zu begutachten.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Sahl und Prof. Dahl für die Teilnahme an der Promotionskommission.

Ein großer Dank gilt meinen Kollegen, die mir viele Aufgaben abnahmen und mich auch in angespannter und gestresster Laune ertrugen. Ich danke besonders Beate, Sabine und Janett für die tatkräftige Unterstützung im Labor, am Rechner und auch privat.

Ich danke meinem Freund Albrecht, der mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat. Hätte er mir nicht den Rücken frei gehalten, wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen. Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Eltern und Geschwister, die meine Arbeit in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Ihnen und meiner Großmutter Waltraud gilt mein besonderer Dank. Danke Melli und Paul, für Eure unermüdliche Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.